

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 604 666**

51 Int. Cl.:

**C12P 19/14** (2006.01)

**C12N 9/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.05.2010 PCT/EP2010/056913**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.11.2010 WO10133644**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2010 E 10723554 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016 EP 2432875**

54 Título: **Polipéptidos de amilasa**

30 Prioridad:

**19.05.2009 EP 09160655**

**19.05.2009 US 179525 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**08.03.2017**

73 Titular/es:

**DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS  
(100.0%)**

**Langebrogade 1  
1411 Copenhagen K, DK**

72 Inventor/es:

**KRAGH, KARSTEN MATTHIAS;  
KELLET-SMITH, ANJA, HEMMINGSEN;  
MIKKELSEN, RENÉ;  
MEJLDAL, RIE y  
JENNER, RIKKE L. BUNDGAARD**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 604 666 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Polipéptidos de amilasa

**Campo de la invención**

- 5 Esta invención se refiere a polipéptidos, específicamente polipéptidos de amilasa y ácidos nucleicos que codifican estos, y sus usos por ejemplo, como exoamilasas no maltogénicas en producción de alimentos o productos alimenticios para animales.

**Antecedentes de la invención**

- Las amilasas mejoradas pueden mejorar los problemas inherentes en ciertos procesos, tales como en la conversión de almidones vegetales, o para hornear.
- 10 La cristalización de la amilopectina tiene lugar en los gránulos de almidón días después del horneado, lo que lleva a un aumento de la firmeza del pan y causa el envejecimiento del pan. Cuando el pan envejece, el pan pierde la suavidad de la miga y la humedad de la miga. Como resultado, las migas se vuelven menos elásticas, y el pan se desarrolla una corteza de cuero.
- 15 La hidrólisis enzimática (por ejemplo, por amilasas) de las cadenas laterales de amilopectina puede reducir la cristalización y aumentar antienviejimiento. La cristalización depende de la longitud de las cadenas laterales de amilopectina: cuanto más largas las cadenas laterales, mayor es la cristalización. La mayoría de los gránulos de almidón se compone de una mezcla de dos polímeros: amilopectina y amilosa, de los cuales aproximadamente el 75% es amilopectina. La amilopectina es una molécula muy grande, ramificada que consiste en cadenas de unidades • unidades de -D-glucopiranosilo unidades por enlaces (1-4), en los que las cadenas están unidas por • uniones -D- (1-6) para formar ramas. La amilosa es una cadena lineal de unidades de • -D-glucopiranosilo unidas (1-4) que tienen pocas ramas • -D- (1-6).
- 20 El horneado de artículos de panificación farináceas tales como pan blanco, pan hecho de harina de centeno y harina de trigo tamizados y rodillos se logra mediante el horneado de la masa de pan en las temperaturas del horno en el rango de 180 a 250°C durante aproximadamente 15 a 60 minutos. Durante el proceso de horneado un gradiente de temperatura pronunciado (200-120°C) prevalece sobre las capas de masa exteriores donde se desarrolla la corteza del producto horneado. Sin embargo, debido al vapor, la temperatura en la miga es solo de aproximadamente 100°C al final del proceso de horneado. A temperaturas superiores de aproximadamente 85°C, se puede producir la inactivación de la enzima y la enzima no tendrá propiedades antienviejimiento. Por lo tanto, solo las amilasas termoestable son capaces de modificar el almidón de manera eficiente durante el horneado.
- 25 La actividad de endoamilasa actividad puede afectar negativamente la calidad del producto de pan final mediante la producción de una miga pegajosa o gomosa debido a la acumulación de dextrinas ramificadas. Se prefiere la actividad de exoamilasa, debido a que lleva a cabo la modificación deseada de almidón que lleva al retraso del envejecimiento, con menos de los efectos negativos asociados con la actividad de endo-amilasa. La reducción de la actividad endoamilasa puede llevar a mayor exoespecificidad, lo que puede reducir las dextrinas ramificadas y producir un pan de mejor calidad.
- 30 La conversión de los almidones vegetales, especialmente almidón de maíz, a etanol es una industria en rápida expansión. El jarabe de maltotetraosa (G4 o DP4) es uno de muchos productos comercialmente importantes derivados del tratamiento enzimático del almidón. La conversión de almidones vegetales, especialmente almidón de maíz, a maltotetraosa y azúcares inferiores, tales como glucosa o maltosa, es una industria en rápida expansión.
- 35 El proceso actual consiste en dos etapas catalizadas por enzimas secuenciales que dan como resultado la producción de glucosa o maltosa. La levadura se puede utilizar para fermentar la glucosa a etanol.
- La primera etapa es catalizada por la enzima es la licuefacción del almidón. Típicamente, una suspensión de almidón se gelatiniza mediante calentamiento rápido a 85°C o más. • -las amilasas (EC 3.2.1.1) se utilizan para degradar el licuefacto viscoso a maltodextrinas. • -amilasas son endohidrolasas que catalizan la escisión aleatoria de enlaces • 1,4-D-glucosídicos internos. A medida que las • -amilasas descomponen el almidón, la viscosidad disminuye. Debido a que la licuefacción se realiza típicamente a temperaturas elevadas, las • -amilasas termoestables, tales como un • -amilasa de Bacillus sp., son las preferidas para esta etapa.
- 40 Las maltodextrinas producidas de esta manera generalmente no pueden ser fermentadas por la levadura para formar alcohol. En consecuencia, se requiere una segunda etapa de sacarificación catalizada enzimáticamente, para descomponer las maltodextrinas. Las glucoamilasas y/o • -amilasas maltogénicas comúnmente se utilizan para catalizar la hidrólisis de extremos no reductores de las maltodextrinas formadas después de licuefacción, la liberación de D-glucosa, maltosa e isomaltosa. Las enzimas desramificantes tales como pululanastas, se pueden usar para ayudar a la sacarificación. La sacarificación generalmente se realiza en condiciones ácidas a temperaturas elevadas, por ejemplo, 60°C, pH 4,3.
- 45
- 50

El jarabe G4 (también denominado como DP4) tiene numerosas propiedades ventajosas en comparación con los jarabes de sacarosa. Por ejemplo, el reemplazo parcial de la sacarosa con jarabe G4 en un alimento reduce la dulzura de la comida sin afectar a su sabor o aroma. El jarabe de G4 tiene una alta retención de la humedad en los alimentos y exhibe productos de reacción de Maillard menos perjudiciales debido a contenido menor de glucosa y maltosa. El jarabe G4 también tiene mayor viscosidad que la sacarosa, lo que mejora la textura de los alimentos. El jarabe de G4 disminuye el punto de congelación del agua menos que el jarabe de sacarosa o alta fructosa, por lo que el jarabe G4 puede controlar mejor los puntos de congelación de los alimentos congelados. Después de la ingestión, el jarabe G4 también afecta la presión osmótica menos que la sacarosa. En conjunto, estas cualidades hacen que el jarabe G4 sea ideal como un ingrediente en alimentos y productos médicos. El jarabe de G4 es útil en otras industrias, también. Por ejemplo, el jarabe de G4 imparte brillo y se puede utilizar ventajosamente como un medidor de papel. Ver, por ejemplo, Kimura et al, "Maltotetraose, a new saccharide of tertiary property", Starch 42: 151-57 (1990).

Una de las levaduras usadas para producir el etanol es *Saccharomyces cerevisiae*. *S. cerevisiae* contiene  $\alpha$ -glucosidasa que se ha demostrado para utilizar mono-, di-, y tri-sacáridos como sustratos. Yoon et al., Carbohydrate Res. 338: 1127-32 (2003). La capacidad de *S. cerevisiae* para utilizar tri-sacáridos se puede mejorar mediante la administración de suplementos  $Mg^{2+}$  y la sobreexpresión de AGT1 permeasa (Stambuck et al, Lett Appl Microbiol 43:370-76 (2006)), sobreexpresión de MTT1 y MTT1alt para aumentar la captación de maltotriosa (Dietvorst et al., Yeast 22: 775-88 (2005)), o la expresión de la MAL32 maltasa en la superficie celular (Dietvorst et al., Yeast 24: 27-38 (2007)). La etapa de sacarificación se puede omitir por completo, si la etapa de licuefacción produjo niveles suficientes de mono-, di-, o tri-sacáridos y se usaron *S. cerevisiae* o sus variantes modificadas genéticamente para la etapa de fermentación.

*Pseudomonas saccharophila* expresa una maltotetrahidrolasa formadora de maltotetraosa (CE 3.2.1.60; amilasa formadora de G4; G4-amilasa). Se ha determinado la secuencia de nucleótidos del gen *P. saccharophila* que codifica PS4. Zhou et al., "Nucleotide sequence of the maltotetrahydrolase gene from *Pseudomonas saccharophila*", FEBS Lett. 255: 37-41 (1989); GenBank Acc. No. X16732. PS4 se expresa como una proteína precursora con un péptido señal N-terminal de 21 residuos. La forma madura de PS4, como se expone en SEQ ID NO: 10, contiene 530 residuos de aminoácidos con un dominio catalítico en el extremo N-terminal y un dominio de unión a almidón en el extremo C-terminal. PS4 muestra tanto actividad endo y exo  $\alpha$ -amilasa. La actividad de endo  $\alpha$ -amilasa es útil para disminuir la viscosidad del almidón gelatinizado, y la actividad de exo  $\alpha$ -amilasa es útil para descomponer las maltodextrinas en sacáridos más pequeños.

### Síntesis de la invención

Esta invención se refiere a polipéptidos, específicamente polipéptidos de amilasa y ácidos nucleicos que los codifican, y sus usos por ejemplo como exoamilasas no maltogénicas en la producción de productos alimenticios. Las amilasas de la presente invención se han manipulado genéticamente para tener cualidades más beneficiosas. En forma específica, las amilasas de la invención actual muestran una exoespecificidad alterada y/o termoestabilidad alterada. En particular, los polipéptidos derivan de los polipéptidos que tienen actividad de exoamilasa no maltogénica, en particular, actividad de glucan 1,4-alfa maltotetrahidrolasa (EC 3.2.1.60). En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente tienen un mejor efecto antienvjecimiento, en comparación con la amilasa de la SEQ ID NO: 1.

En otro aspecto, los polipéptidos definidos en la presente tienen una mejor termoestabilidad en comparación con la amilasa de la SEQ ID NO: 1.

Se proporciona una variante de polipéptido que se exponen en las reivindicaciones. En un aspecto adicional, se proporciona el uso de tal variante de polipéptido, que se incluye en y como aditivos alimentarios, productos alimenticios, productos de productos de panadería, composiciones mejoradoras, productos alimenticios, que incluyendo alimentos para animales, etc. tal como se establece en las reivindicaciones. En un aspecto adicional, se proporcionan ácidos nucleicos que codifican y que se refieren a variantes de polipéptidos, como se establece en las reivindicaciones. Los métodos para producir tales variantes de polipéptidos, así como otros aspectos, también se estableces en las reivindicaciones.

### Leyendas de las figuras

Las figuras acompañantes se incorporan y constituyen una parte de esta memoria descriptiva e ilustran varias formas de realización.

La Fig. 1 muestra el desarrollo de firmeza del pan horneado con pMS1776 (SEQ ID NO: 12), pMS2020 (SEQ ID NO: 14), pMS2022 (SEQ ID NO: 15) y pMS2062 (SEQ ID NO: 16) en comparación con el pan horneado con una composición que comprende la SEQ ID NO: 1.

La Fig. 2 muestra el desarrollo de firmeza del pan horneado con pMS1776 (SEQ ID NO: 12), pMS1934 (SEQ ID NO: 13), pMS2022 (SEQ ID NO: 15) y pMS2062 (SEQ ID NO: 16) en comparación con el pan horneado con una composición que comprende la SEQ ID NO: 1 y Novamil 1500,

**Descripción detallada de la invención**

De acuerdo con esta descripción detallada, se aplican las siguientes abreviaturas y definiciones. Cabe señalar que, como se usa en la presente, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una enzima" incluye una pluralidad de tales enzimas, y la referencia a "la formulación" incluye la referencia a una o más formulaciones y equivalentes de estas conocidos por los expertos en la técnica, y similares,

En un aspecto, se proporciona un polipéptido que tiene actividad de amilasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 78% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y donde el polipéptido comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 235 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como la SEQ ID NO: 1, dicho polipéptido tiene mejor termoestabilidad cuando se compara con la SEQ ID NO: 1.

La presente invención también abarca el uso de polipéptidos que tienen un grado de identidad de secuencia u homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos definida en la presente o con un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente. La presente invención abarca, en particular, péptidos que tienen un grado de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, que se define a continuación u homólogos de estos. En la presente, el término "homólogo" significa una identidad de secuencia de entidad que tiene la presente secuencia de aminoácidos o la presente secuencias de nucleótidos, donde la secuencia de aminoácidos presente es con preferencia la SEQ ID NO: 1 y la presente secuencia de nucleótidos es con preferencia la SEQ ID NO: 52.

En un aspecto, la secuencia de aminoácidos y/o secuencia de nucleótidos homóloga puede proporcionar y/o codificar un polipéptido que retiene la actividad funcional y/o mejora la actividad de un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 10, con preferencia la actividad de un polipéptido de la SEQ ID NO: 1.

En el presente contexto, se toma una secuencia homóloga para incluir una secuencia de aminoácidos que puede ser al menos 78%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%, idéntica a la secuencia presente. Normalmente, los homólogos comprenderán los mismos sitios activos etc. que la presente secuencia de aminoácidos. Aunque la homología también se puede considerar en términos de semejanza (es decir, residuos de aminoácidos que tienen propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

Las comparaciones de identidad de secuencia se pueden realizar a simple vista, o más normalmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas informáticos disponibles en el comercio utilizan algoritmos de comparación complejos para alinear dos o más secuencias que reflejan mejor los eventos evolutivos que podría haber llevado a la diferencia) entre las dos o más secuencias. Por lo tanto, estos algoritmos funcionan con un sistema de puntuación de recompensa del alineamiento de aminoácidos idénticos o similares y la penalización de la inserción de las brechas, extensiones de brecha y alineamientos de los aminoácidos no similares. El sistema de puntuación de los algoritmos de comparación incluye:

i) la asignación de una puntuación de penalización cada vez que se inserta una brecha (puntuación de penalización de la brecha),

ii) la asignación de una puntuación de penalización cada vez que se extiende una brecha existente con una posición extra (puntuación de la penalización de extensión),

iii) la asignación de puntuaciones altas después del alineamiento de aminoácidos idénticos, y

iv) la asignación de puntuaciones variables después del alineamiento de aminoácidos no idénticos.

La mayoría de los programas de alineamiento permiten modificar las penalizaciones. Sin embargo, se prefiere utilizar los valores predeterminados cuando se utiliza tal software para las comparaciones de secuencias.

Las puntuaciones dadas para el alineamiento de los aminoácidos no idénticos se asignan de acuerdo con una matriz de puntuación también llamada una matriz de sustitución. Las puntuaciones provistas en tales matrices de sustitución están reflejando el hecho de que la probabilidad de que un aminoácido sea sustituido con otro durante la evolución varía y depende la naturaleza física/química del aminoácido para sustituir. Por ejemplo, la probabilidad de que un aminoácido polar sea sustituido con otro aminoácido polar es mayor en comparación con que sea sustituido con un aminoácido hidrofóbico. Por lo tanto, la matriz de puntuación asignará la puntuación más alta de aminoácidos idéntica, menor puntuación de aminoácidos no idénticos, pero similares e incluso más baja puntuación para los aminoácidos no similares no idénticos. Las matrices de puntuación más frecuentemente usadas son las matrices PAM (Dayhoff et al. (1978), Jones et al. (1992)), las matrices BLOSUM (Henikoff y Henikoff (1992)) y la matriz de Gonnet (Gonnet et al. (1992)).

Los programas de computadora adecuados para llevar a cabo tal alineamiento incluyen, pero sin limitación, Vector NTI (Invitrogen Corp.) y los programas ClustalV, ClustalW y ClustalW2 (Higgins DG y Sharp PM (1988), Higgins et al.

(1992), Thompson et al. (1994), Larkin et al. (2007). Una selección de diferentes herramientas de alineamiento están disponibles desde el servidor ExPASy Proteomics en [www.expasy.org](http://www.expasy.org). Otro ejemplo de software que puede realizar el alineamiento de secuencia es BLAST (herramienta de búsqueda de alineamiento local básico), que está disponible en la página web del National Center for Biotechnology Information que en la actualidad se pueden encontrar [en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) y que fue descrito en primer lugar en Altschul et al. (1990). J. Mol Biol 215; 403-410.

Una vez que el software ha producido un alineamiento, es posible calcular el % de semejanza y el % de identidad de secuencia. El software normalmente realiza esto como parte de la comparación de secuencias y genera un resultado numérico.

En una forma de realización, se prefiere utilizar el software ClustalW para realizar alineamientos de secuencias. Con preferencia, el alineamiento con ClustalW se lleva a cabo con los siguientes parámetros para el alineamiento por pares:

Matriz de sustitución:	Gonnet 250
Penalización de apertura de brecha:	20
Penalización de extensión de la brecha:	0.2
Penalización de fin de la brecha:	Ninguno

ClustalW2 está, por ejemplo, disponible en Internet por el Instituto Europeo de Bioinformática en la página web [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk) EMBL-EBI en herramientas – análisis de secuencia - ClustalW2. En la actualidad, la dirección exacta de la herramienta ClustalW2 es [www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2).

En otra forma de realización, se prefiere utilizar el programa Align X de Vector NTI (Invitrogen) para realizar alineamientos de secuencias. En una forma de realización, se ha usado Exp10 con la configuración predeterminada:

Penalidad de apertura de brecha: 10

Penalización de extensión de la brecha: 0.05

Rango de penalización de la separación de brecha: 8

Matriz de puntuación: blosum62mt2

Por lo tanto, la presente invención también abarca el uso de variantes, homólogos y derivados de cualquier secuencia de aminoácidos de una proteína o polipéptido como se define en la presente, en particular los de la SEQ ID NO: 1 o las de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 ó 10 se define a continuación,

Las secuencias, en particular las de las variantes, homólogos y derivados de la SEQ ID NO: 1, también pueden tener supresiones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos que producen un cambio silencioso y producen una sustancia funcionalmente equivalente. Las sustituciones de aminoácidos deliberadas se pueden realizar sobre la base de la semejanza de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad, y/o la naturaleza anfipática de los residuos siempre que se retenga la actividad de unión secundaria de la sustancia. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos de cabeza polares no cargados que tienen valores de hidrofiliidad similares incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

La presente invención también abarca una sustitución conservadora (sustitución y reemplazo se usan en la presente para significar el intercambio de un residuo de aminoácido existente, con un residuo alternativo) que se puede producir es decir sustitución de igual a igual, tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc. La sustitución no conservadora también se puede producir, es decir, de una clase de residuo a otro, o que alternativamente involucra la inclusión de aminoácidos no naturales tales como ornitina (de aquí en adelante en la presente denominada como Z), ornitina del ácido diaminobutírico (de aquí en adelante en la presente denominada como B), ornitina norleucina (de aquí en adelante en la presente denominada como O), pirilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

Las sustituciones conservadoras que se pueden realizar están, por ejemplo dentro de los grupos de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos alifáticos (alanina, valina, leucina, isoleucina), aminoácidos polares (glutamina, asparagina, serina, treonina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), hidroxilaminoácidos (serina, treonina), aminoácidos grandes (fenilalanina y triptófano) y aminoácidos pequeños (glicina, alanina).

Los reemplazos también se pueden realizar mediante aminoácidos no naturales e incluyen; aminoácidos alfa \* y alfa-disustituidos\*, N-alquil aminoácidos \*, ácido láctico \*, derivados de haluro de aminoácidos naturales tales como

5 trifluorotirosina \*, p-Cl-fenilalanina \*, p-Br-fenilalanina \*, p-I-fenilalanina \*, L-alil-glicina \*, β-alanina\*, ácido L-α-amino butírico\*, ácido L-γ-amino butírico\*, ácido L-α-amino isobutírico\*, ácido L-ε-amino caproico#, ácido 7-amino heptanoico\*, L-metionina sulfona#, L-norleucina\*, L-norvalina\*, p-nitro-L-fenilalanina\*, L-hidroxiprolina#, L-tioprolina\*, metil derivados de fenilalanina (Phe) tales como 4-metil-Phe\*, pentametil-Phe\*, L-Phe (4-amino)\*, L-Tyr (metil)\*, L-Phe (4-isopropil)\*, L-Tic (ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilo)\*, ácido L-diaminopropiónico# y L-Phe (4-benci)\*. Se ha usado la notación \* para el fin de la discusión anterior (con relación a la sustitución homóloga o no conservadora), para indicar la naturaleza hidrofóbica del derivado mientras que # se ha usado para indicar la naturaleza hidrofílica del derivado #\* indica características anfipáticas.

10 Las variantes de secuencias de aminoácidos pueden incluir grupos espaciadores adecuados que se pueden insertar entre cualquiera de dos residuos de aminoácidos de la secuencia que incluyen grupos alquilo tales como grupos metilo, etilo o propilo, además de espaciadores de aminoácidos tales como residuos de glicina o β-alanina. Una forma adicional de variación, que implica la presencia de uno o más residuos de aminoácidos en forma peptoides, será bien entendida por los expertos en la técnica. Para evitar dudas, "la forma peptoides" se utiliza para referirse a variantes de los residuos de aminoácidos en los que el grupo sustituyente α-carbono está en átomo de nitrógeno del residuo en lugar del α-carbono. Los procesos para preparar péptidos en forma peptoides son conocidos en la técnica, por ejemplo Simon RJ et al. (1992), Horwell DC. (1995).

15 En una forma de realización, la variante de polipéptido es una variante de amilasa de *Pseudomonas saccharophila* (PS4) que tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 y que tiene al menos al menos 78%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con esta.

En un aspecto, con preferencia la secuencia utilizada en la presente invención está en una forma purificada. El término "purificado" significa que un componente dado está presente en un nivel alto. El componente es de forma deseable, el componente activo predominante presente en una composición.

#### Definiciones

25 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto en la técnica. Los siguientes términos se proporcionan a continuación.

30 "Amilasa" significa una enzima que es, entre otras cosas, capaz de catalizar la degradación del almidón. Una actividad de la amilasa de acción endo escinde enlaces α-D- (1 → 4) O-glicosídicos dentro de la molécula de almidón de una manera aleatoria. Por el contrario, una actividad amilolítica de acción exo escinde una molécula de almidón del extremo no reductor del sustrato. "Actividad de amilasa de acción endo", "endo-actividad", "actividad endo-específica" y "endo-especificidad" son sinónimos, cuando los términos se refieren a las variantes de polipéptidos tal como se definen en las reivindicaciones. Lo mismo es válido para los términos correspondientes para actividad exo.

35 "Maltotetrahidrolasa formadora de maltotetraosa; EC 3.2.1.60; amilasa formadora de G4; G4-amilasa y glucano 1,4-alfa-maltotetrahidrolasa" se pueden usar de manera intercambiable".

En el presente contexto "" PS4 "se utiliza para designar el maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila*.

40 Una "variante" o "variantes" se refiere a polipéptidos o ácidos nucleicos. El término "variante" se puede usar indistintamente con el término "mutante". Las variantes incluyen inserciones, sustituciones, transversiones, truncamientos, y/o inversiones en una o más localizaciones en la secuencia de aminoácidos o de nucleótidos, respectivamente. Las frases "variante de polipéptido", "polipéptido", "variante" y "variante de la enzima" significa un polipéptido/proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que se ha modificado de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Las variantes de polipéptidos incluyen un polipéptido que tiene un cierto porcentaje, por ejemplo, 78%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%, de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. Como se usa en la presente, "enzimas originales", "secuencia original", "polipéptido original" significan enzimas y polipéptidos a partir de los cuales se basan las variantes de polipéptidos, por ejemplo, SEQ ID NO: 1. Un "ácido nucleico original" significa una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido original. La secuencia de señal de una "variante" puede ser la misma (por ejemplo, SEQ ID NO: 11) o puede diferir de la secuencia señal de la PS4 de tipo salvaje. Una variante se puede expresar como una proteína de fusión que contiene un polipéptido heterólogo. Por ejemplo, la variante puede comprender un péptido señal de otra proteína o una secuencia diseñada para ayudar a la identificación o purificación de la proteína de fusión expresada, tal como una secuencia de His-Tag.

55 Para describir las diferentes variantes que se consideran abarcadas por la presente descripción, se adoptará la siguiente nomenclatura para facilitar la referencia. Cuando la sustitución incluye un número y una letra, por ejemplo, 141P, entonces se refiere a {posición de acuerdo con el sistema de numeración /aminoácido sustituido}. De acuerdo con ello, por ejemplo, la sustitución de un aminoácido a prolina en la posición 141 se designa como 141P. Cuando la sustitución incluye una letra, un número, y una letra, por ejemplo, A141P, entonces se refiere a {aminoácido original/ posición de acuerdo con el sistema de numeración /aminoácido sustituido}. De acuerdo con ello, por ejemplo, la sustitución de alanina con prolina en la posición 141 se designa como A141P.

Cuando son posibles dos o más sustituciones en una posición particular, esta se denominará con letras contiguas, que puede estar opcionalmente separados por marcas de barra "/", por ejemplo, G303ED o G303E/D.

Las posiciones y sustituciones de aminoácidos mencionadas en la presente documento se listan con referencia a la posición correspondiente y el aminoácido correspondiente de la SEQ ID NO: 1. Las posiciones equivalentes en otra secuencia se pueden encontrar mediante el alineamiento de esta secuencia con la SEQ ID NO: 1 para encontrar un alineamiento con el porcentaje de identidad más alto y determinar a partir de entonces cuál aminoácido se alinea para corresponder con un aminoácido de una posición específica de la SEQ ID NO: 1. Tal alineamiento y uso de una secuencia como una primera referencia es simplemente una cuestión de rutina para un experto en la técnica.

Las "variantes de ácidos nucleicos" pueden incluir secuencias que son complementarias a las secuencias que son capaces de hibridarse con las secuencias de nucleótidos presentadas en este documento, en particular, con la SEQ ID NO: 52. Por ejemplo, una variante de secuencia es complementaria a secuencias capaces de hibridarse en condiciones rigurosas, por ejemplo, (50°C y 0,2X SSC (1X SSC = NaCl 0,15 M, citrato de sodio 0,015 M, pH 7,0), a las secuencias de nucleótidos presentadas en este documento, en particular, a la SEQ ID NO: 52 (ADN pMS 382). Más particularmente, el término variante abarca secuencias que son complementarias a las secuencias que son capaces de hibridar en condiciones muy rigurosas, por ejemplo, 65°C y 0,1 x SSC, a las secuencias de nucleótidos presentadas en este documento, en particular, a la SEQ ID NO: 52 (ADN pMS 382). El punto de fusión (T<sub>m</sub>) de una variante de ácido nucleico puede ser de aproximadamente 1, 2, o 3°C inferior a la T<sub>m</sub> del ácido nucleico de tipo salvaje. Las variantes de ácidos nucleicos incluyen un polinucleótido que tiene un cierto porcentaje, por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, o 99%, de identidad de secuencia con el ácido nucleico que codifica SEQ ID NO: 1.

Como se usa en la presente, el término "expresión" se refiere al proceso por el cual se produce un polipéptido sobre la base de la secuencia de ácidos nucleicos de un gen. El proceso incluye tanto la transcripción como la traducción.

"Aislado" significa que la secuencia está al menos sustancialmente libre de al menos otro componente que la secuencia asociada naturalmente y hallada en la naturaleza, por ejemplo, secuencias genómicas.

"Purificado" significa que el material está en un estado relativamente puro, por ejemplo, al menos aproximadamente 90% puro, al menos aproximadamente 95% de pureza, o al menos aproximadamente 98% puro.

"Termoestable" significa que la enzima mantiene su actividad después de la exposición a temperaturas elevadas. La termoestabilidad de una enzima se puede medir por su vida media (t<sub>1/2</sub>), donde la mitad de la actividad enzimática se pierde por la vida media. El valor de la vida media se calcula en unas condiciones determinadas mediante la medición de la actividad de la amilasa residual. Para determinar la vida media de la enzima, la muestra se calienta a la temperatura de ensayo durante 1-10 min, y la actividad se mide usando un ensayo estándar para la actividad de la amilasa, tal como el ensayo Betamyl® (Megazyme, Irlanda).

Como se usa en la presente, "pH óptimo" significa el pH en el que las variantes de polipéptidos descritas en la presente muestran la actividad en un ensayo estándar para la actividad de la amilasa, medida en un rango de pH.

Como se usa en la presente, "polipéptido" se usa de forma intercambiable con las expresiones "secuencia de aminoácidos", "enzima", "péptido" y/o "proteína". Como se usa en la presente, "secuencia de nucleótidos" o "secuencia de ácido nucleico" se refiere a una secuencia de oligonucleótido o secuencia de polinucleótidos y variantes, homólogos, fragmentos y derivados de estos. La secuencia de nucleótidos puede ser de origen genómico, sintético o recombinante y puede ser de cadena doble o cadena simple, sea que represente la cadena de sentido o anti-sentido. Como se usa en la presente, la expresión "secuencia de nucleótidos" incluye ADN genómico, ADNc, ADN sintético y ARN.

"Homólogo" significa una entidad que tiene un cierto grado de identidad u "homología" con las secuencias de aminoácidos presentes y las secuencias de nucleótidos presentes. Una "secuencia homóloga" incluye un polinucleótido o un polipéptido que tiene un cierto porcentaje, por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, o 99%, de identidad de secuencia con otra secuencia. El porcentaje de identidad significa que, cuando se alinean, ese porcentaje de bases o residuos de aminoácidos son los mismos que cuando se comparan las dos secuencias. Las secuencias de aminoácidos no son idénticas, donde se sustituye, elimina o añade un aminoácido en comparación con la secuencia presente. El porcentaje de identidad de secuencia típicamente se mide con respecto a la secuencia madura de la proteína presente, es decir, por ejemplo después de la eliminación de una secuencia señal. Típicamente, los homólogos comprenderán los mismos residuos del sitio activo que la presente secuencia de aminoácidos. Los homólogos también retienen actividad de la amilasa, aunque el homólogo puede tener diferentes propiedades enzimáticas que la PS4 de tipo salvaje.

Como se usa en la presente, "hibridación" incluye el proceso por el cual una cadena de ácido nucleico se une con una cadena complementaria a través de apareamiento de bases, así como el proceso de amplificación que se lleva a cabo en las tecnologías de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La variante de ácido nucleico puede existir como ADN o ARN de cadena simple o doble, un heterodúplex de ADN/ARN o un copolímero ARN/ADN. Como se usa en la presente, "copolímero" se refiere a una cadena de ácido nucleico simple que comprende tanto ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos. La variante de ácido nucleico se puede optimizar por codones para aumentar adicionalmente la expresión.

Como se usa en la presente, un compuesto "sintético" se produce por síntesis química o enzimática in vitro. Incluye, pero sin limitación, variantes de ácidos nucleicos hechos con el uso óptimo de codones para los organismos huésped, tales como una célula huésped de levadura u otros huéspedes de expresión de elección.

5 Como se usa en la presente, la "célula transformada" incluye células, que incluyen células bacterianas y fúngicas, que se han transformado mediante el uso de técnicas de ADN recombinante. La transformación se produce normalmente mediante la inserción de una o más secuencias de nucleótidos en una célula. La secuencia de nucleótidos insertada puede ser una secuencia de nucleótidos heteróloga, es decir, es una secuencia que no es natural para la célula que se debe transformar, tal como una proteína de fusión.

10 Como se usa en la presente, "unido operativamente" significa que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista. Por ejemplo, una secuencia reguladora unida operativamente a una secuencia codificadora se liga de tal manera que la expresión de la secuencia codificadora se obtiene en condiciones compatibles con las secuencias de control.

15 Como se usa en la presente, el término "almidón" se refiere a cualquier material compuesto de los hidratos de carbono de polisacáridos complejos de plantas, tales como maíz, compuesto de amilosa y amilopectina con la fórmula  $(C_6H_{10}O_5)_x$ , donde X puede ser cualquier número. El término "almidón granular" se refiere a almidón crudo, es decir, almidón sin cocer, por ejemplo, que no se ha sometido a gelatinización.

20 El término "licuefacción" se refiere a la etapa en la conversión del almidón en el que gelatiniza el almidón se hidroliza para dar dextrinas solubles de bajo peso molecular. Como se usa en la presente, el término "sacarificación" se refiere a la conversión enzimática de almidón a glucosa. El término "grado de polimerización" (DP) se refiere al número (n) de unidades glucopiranosas anhídras en un sacárido determinado. Los ejemplos de DP1 son los monosacáridos glucosa y fructosa. Los ejemplos de DP2 son los disacáridos maltosa y sacarosa.

Como se usa en la presente, la expresión "contenido de sólidos secos" (ds) se refiere a los sólidos totales de una suspensión en una base de porcentaje en peso seco. El término "suspensión" se refiere a una mezcla acuosa que contiene sólidos insolubles.

25 La frase "sacarificación y fermentación simultáneas (SSF)" se refiere a un proceso en el que un microorganismo productor de etanol y al menos una enzima, tal como PS4 o una variante de esta, están presentes durante la misma etapa del proceso. SSF se refiere a la hidrólisis simultánea de sustratos de almidón granular a sacáridos y la fermentación de los sacáridos en alcohol, por ejemplo, en el mismo recipiente del reactor.

30 Como se usa en la presente, "microorganismo etanológico" se refiere a un microorganismo con la capacidad de convertir un azúcar u oligosacárido a etanol.

## 1.2. Abreviaturas

Las siguientes abreviaturas se aplican a menos que se indique lo contrario:

	ADA	azodicarbonamida
	cDNA	ADN complementario
35	CGTase	ciclodextrina glucanotransferasa
	DEAE	dietilaminoetanol
	dH <sub>2</sub> O	agua desionizada
	DNA	ácido desoxirribonucleico
	ds-ADN	ADN de cadena doble
40	EC	comisión de enzimas para la clasificación de enzimas
	FGSC	Fungal Genetics Stock Center
	G121F	residuo de glicina (G) en la posición 121 de la SEQ ID NO: 2 se reemplaza con un residuo de fenilalanina (F), donde los aminoácidos se designan con las abreviaturas de una sola letra comúnmente conocida en la técnica
45	HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
	mARN	ácido ribonucleico mensajero
	PCR	reacción en cadena de polimerasa



	PDB	base de datos de proteína
	PEG	polietilenglicol
	ppm	partes por millón
	PS4	amilasa formadora de G4 <i>P. saccharophila</i>
5	RT-PCR	reacción en cadena de polimerasa- transcriptasa inversa
	SAS	amilasa formadora de G4 <i>P. saccharophila</i>
	SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
	1X SSC	NaCl 0,15 M, citrato de sodio 0,015 M, pH 7,0
	SSF	sacarificación y fermentación simultánea
10	$t_{1/2}$	vida media
	Tm	temperatura de fusión (°C) a la que funde el 50% de la proteína presente
	$\Delta Tm$	°C de aumento en la Tm
	w/v	peso/volumen
	w/w	peso/peso

15 2. Variantes de polipéptidos de la SEQ ID NO: 1

En un aspecto, se proporciona un polipéptido que tiene una sustitución en una o más posiciones que produce una propiedad alterada, que puede ser cualquier combinación de exospecificidad, endoespecificidad o termoestabilidad alterada, o una alteración de propiedades de manipulación, en relación con la SEQ ID NO: 1. Tales variantes de polipéptidos se denominan también en la presente por conveniencia como "variante del polipéptido", "variante de polipéptido" o "variante". En un aspecto, los polipéptidos tal como se definen en la presente tienen un efecto antienviejecimiento mejorado en comparación con la amilasa de la SEQ ID NO: 1. En otro aspecto, los polipéptidos tal como se definen en la presente tienen una termoestabilidad mejorada en comparación con la amilasa de la SEQ ID NO: 1. En formas de realización muy preferidas, tienen la ventaja añadida de una mayor termoestabilidad, o actividad exoamilasa mayor o una mayor estabilidad de pH, o cualquier combinación.

25 En un aspecto, las variantes definidas en la presente exhiben actividad enzimática. En un aspecto, las variantes de polipéptidos comprenden actividad de amilasa. En un aspecto adicional, las variantes de polipéptidos comprenden actividad de exoamilasa. En un aspecto adicional, las variantes de polipéptidos exhiben actividad de exoamilasa no maltogénica. En un aspecto, las variantes definidas en la presente se pueden derivar de la  $\alpha$ -amilasa de *Pseudomonas saccharophila* (PS4). En un aspecto, las variantes definidas en la presente son una maltotetrahidrolasa formadora de maltotetraosa, también denominada EC 3.2.1.60; amilasa formadora de G4; G4-amilasa o glucan 1,4- $\alpha$ -maltotetrahidrolasa.

35 Las composiciones, que incluyen aditivos alimentarios, productos alimenticios, productos de panadería, composiciones mejoradoras, productos alimenticios, que incluyendo alimentos para animales, etc. que comprenden tales variantes de polipéptidos definidas en la presente, tales como los que tienen actividad exoamilasa no maltogénica, así como métodos de fabricación y uso de tales polipéptidos y las composiciones, se proporcionan en la presente.

40 Como se señaló anteriormente, las variantes de polipéptidos pueden comprender una o más propiedades de manipulación mejoradas, con preferencia propiedades de horneado mejoradas. Por lo tanto, las variantes de polipéptidos son tales que los productos alimenticios así tratados tienen una o más de (con preferencia todas de) una firmeza inferior, una elasticidad superior, una cohesión superior, una friabilidad inferior o mayor capacidad de plegado. Tales propiedades de manipulación u horneado mejoradas exhibidas por los polipéptidos variantes se describen con más detalle a continuación.

45 Además, se proporciona un tratamiento de los productos alimenticios, en particular masas y productos de panadería con tales polipéptidos, y de modo que tales productos alimenticios presentan las cualidades deseadas anteriormente expuestas.

Además se proporcionan otros usos de las variantes descritas en la presente y composiciones que comprenden estas variantes, tales como en la preparación de detergentes, como edulcorantes, jarabes, etc. Las composiciones incluyen el polipéptido junto con al menos otro componente. En particular, se proporcionan aditivos para alimentos o alimentos para animales que comprenden los polipéptidos.

Se proporciona un polipéptido aislado y/o purificado que comprende una variante de polipéptido definida en la presente. En una forma de realización, la variante de polipéptido es una forma madura del polipéptido (SEQ ID NO: 1), donde se escinde la secuencia líder de 21 aminoácidos, de modo que el extremo N-terminal del polipéptido comienza en el residuo de ácido aspártico (D). En un aspecto, las variantes incluyen un dominio de unión de almidón C-terminal. Una secuencia de aminoácidos representativa de un dominio de unión al almidón comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36. Otras variantes incluyen las variantes donde se han añadido o suprimido entre uno y aproximadamente 25 residuos de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO: 1. En un aspecto, la variante tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, donde se ha sustituido cualquier número entre uno y aproximadamente 25 aminoácidos. En un aspecto adicional, la variante tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, donde se ha sustituido cualquier número entre tres y doce aminoácidos. En un aspecto adicional, la variante tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, donde se ha sustituido cualquier número entre cinco y nueve aminoácidos.

En un aspecto, se han sustituido al menos dos, en otro aspecto al menos tres, y aún en otro aspecto al menos cinco aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

En un aspecto adicional, la longitud de la variante del polipéptido es 390 a 540 aminoácidos. En un aspecto adicional, la longitud de la variante del polipéptido es 410 a 440 aminoácidos. En un aspecto adicional, la longitud de la variante del polipéptido es 420 a 435 aminoácidos. En un aspecto adicional, la longitud de la variante del polipéptido es 429 a 430 aminoácidos.

En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente además comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: 88, 205, 240, 248, 266, 311, 377 ó 409 y/o una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K/A/V/N/I/H/F, 34Q, 100Q/K/N/R, 272D o 392K/D/E/Y/N/Q/R/S/T/G. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente además comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: 88, 205, 240, 311 ó 409 y/o una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K/N/I/H/F, 272D, o 392 K/D/E/Y/N/Q/R/S/T/G. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende sustituciones de aminoácidos al menos en cuatro, cinco o en todas las siguientes posiciones: 88, 205, 235, 240, 311 o 409 y/o tiene al menos una, o dos de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K/N/I/H/F, 272D o 392 K/D/E/Y/N/Q/R/S/T/G. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente además comprende uno o más de los siguientes aminoácidos 33Y, 34N, 70D, 121F, 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E/S/K/A, 229P, 307K, 309P y 334P. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente further tiene los siguientes aminoácidos 33Y, 34N, 70D, 121F, 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 229P, 307K, 309P y 334P. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene al menos una de las sustituciones de aminoácidos en b) del punto 1 y además comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: 44, 96, 204, 354 o 377. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 34Q. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 42K/F/H/I/N/A/V. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 42K/F/H/I/N. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 42K. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 88. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 88L/Y/K. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 88L. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 88Y. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 205. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 205L/K/M/N/Q/R/V/Y. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 205L/K/M/N/Q/R/V. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 205L. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 235H/K/R/Q/S. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 235H/K/R/Q. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 235H/K/R. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 235R. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 235H. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 235K. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 240. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 240E/H/M/D/S. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 240E/H/M/D. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 240E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 272D. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 311. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 311P. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 409. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 409H/Q/T/E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 409E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 100Q/K/N/R. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 100Q. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 392D/E/K/Y/N/Q/R/S/T/G. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 392D/E/K/Y/N/Q/R/S/T. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 392D/E/K/Y. En un aspecto adicional, el

polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 392D. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 392E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 392K. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 392Y. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene ambos de los siguientes aminoácidos 235R y 311P. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 16. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 16/A/E/K. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 48. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 48/C/L. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 97. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 105. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 105/N/R. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 248. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 266. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 347. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 347/C/D/H/K. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 350. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 350E/H/N. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 354. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 354D/E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 362. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 362E/H/P. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 364. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 364E/K/NQ. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 369. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 369I/N. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 377. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 393. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 393D/E/K. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 395. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 395C/E/K. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 396. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 396D/E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 399. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 399C/H. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 400. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 400S/W. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 401. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 401D/K. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 403. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 403E/T/V. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 412. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 412D/N. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente además comprende uno o más de los siguientes aminoácidos 121F, 134R, 141P, 229P, o 307K. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene uno o más de los siguientes aminoácidos 42K, 88L, 205L, 235R, 240E, 272D, 311P, 392D, o 409E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende los siguientes aminoácidos 42K, 88L, 235R, 311P, 392D y 223S, 223K o 223A. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente además comprende uno o más seleccionados del grupo que consiste en 272D, 409E, 205L y 240E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene al menos cuatro, cinco, seis, siete u ocho de los siguientes aminoácidos 42K, 88L, 205L, 235R, 240E, 272D, 311P, 392D, o 409E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 223A/K/S. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene los siguientes aminoácidos 42K, 88L, 223S, 235R, 311P y 392D. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene los siguientes aminoácidos 42K, 88L, 223K, 235R, 272D, 311P y 392D. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene los siguientes aminoácidos 42K, 88L, 223S, 235R, 311P, 392D y 409E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene los siguientes aminoácidos 42K, 88L, 205L, 223S, 235R, 311P, 392D y 409E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene los siguientes aminoácidos 42K, 88L, 205L, 223K, 240E, 235R, 311P, 392D y 409E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene los siguientes aminoácidos 42K, 88L, 205L, 223A, T235R, 311P, 392D y 409E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene uno o más aminoácidos en el extremo N-terminal. En un aspecto, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido M en el extremo N-terminal. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: 88, 205, 235 o 409 y/o una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K, 34Q, 100Q, 223A/S, 240E, 311P, 392D, o 409E con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K, 34Q, 88K/L/Y, 100Q, 205L, 223A/S/K, 235K/H/Q/R, 240E/D, 248H, 266T, 311P, 377D/E/P, 392K/D/Y o 409E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 34Q, 42K, 88L, 100Q, 205L, 223A/S/K, 235K/R, 240E, 311P, 392D o 409E. En un aspecto adicional, el

- polipéptido definido en la presente comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: 235R y 311P. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende la sustitución de aminoácidos 42K. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K y 223S. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K, 223S y 392D. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K, 88L, 223A, 235R, 311P y 392D. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K, 88L, 205L, 223S, 235R, 240E, 311P, 392D y 409E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K, 88L, 205L, 223K, 235R, 240E, 311P, 392D y 409E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K, 88L, 205L, 223S, 235R, 311P y 392D. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: 34Q, 42K, 88L, 205L, 223K, 235R, 240E, 311P, 392D y 409E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K, 88L, 100Q, 205L, 223K, 235R, 240E, 311P, 392D y 409E.
- 15 Las formas de realización representativas de los polipéptidos definidos en la presente comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34. Otras formas de realización representativas de los polipéptidos definidos en la presente comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, y SEQ ID NO: 17. Otras formas de realización representativas de los polipéptidos definidos en la presente tiene una secuencia de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34. Otras formas de realización representativas de los polipéptidos definidos en la presente tiene una secuencia de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, y SEQ ID NO: 17, y opcionalmente uno o más aminoácidos en el extremo N-terminal.
- 30 En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente comprenden la secuencia HGGDEIILQFHWN (SEQ ID NO: 37) en las posiciones correspondientes a las posiciones 13-26 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.
- En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente comprenden la secuencia DGF-X1-AIW-X2-P-X3-PWRD-X4-SSW (SEQ ID NO: 38), donde X1 es S o T, X2 es M o L, X3 es V o P y X4 es cualquier residuo de aminoácido natural, con preferencia un L-aminoácido, en las posiciones correspondientes a las posiciones 49-66 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.
- 35 En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente comprenden la secuencia GGEGYFW (SEQ ID NO: 39) en las posiciones correspondientes a las posiciones 79-85 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.
- En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente comprenden la secuencia VPNH (SEQ ID NO: 40) en las posiciones correspondientes a las posiciones 114-117 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.
- 40 En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente comprenden la secuencia CDDGD (SEQ ID NO: 41) en las posiciones correspondientes a las posiciones 150-154 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.
- En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente comprenden la secuencia AGGFRFDFVRG (SEQ ID NO: 42) en las posiciones correspondientes a las posiciones 187-197 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.
- 45 En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente comprenden la secuencia FALK (SEQ ID NO: 43) en las posiciones correspondientes a las posiciones 256-259 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.
- 50 En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente comprenden la secuencia WREVAVTFVDNHD (SEQ ID NO: 44) en las posiciones correspondientes a las posiciones 282-294 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.
- En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente comprenden la secuencia GYSPG (SEQ ID NO: 45) en las posiciones correspondientes a las posiciones 296-300 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.
- 55

En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente comprenden la secuencia GQH (SEQ ID NO: 46) en las posiciones correspondientes a las posiciones 304-306 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.

5 En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente comprenden la secuencia AYAYI (SEQ ID NO: 47) en las posiciones correspondientes a las posiciones 318-322 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.

En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente comprenden la secuencia SPGTP (SEQ ID NO: 48) en las posiciones correspondientes a las posiciones 325-329 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.

10 En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente comprenden la secuencia VYW (SEQ ID NO: 49) en las posiciones correspondientes a las posiciones 331-333 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.

15 En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente comprenden la secuencia HMYDWG (SEQ ID NO: 50) en las posiciones correspondientes a las posiciones 335-340 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.

En otro aspecto, la variante del polipéptido definida en la presente tiene la secuencia de la SEQ ID NO:1, donde se ha sustituido cualquier número entre uno y aproximadamente 25 aminoácidos. Los ejemplos representativos de las variantes de polipéptidos tienen sustituciones de aminoácidos únicas o diversas se muestran en la siguiente TABLA A:

pMS	Mutaciones en comparación con pMS382 que tienen la SEQ ID NO:1
pms1104 (SEQ ID NO: 20)	Q42K
pms1105 (SEQ ID NO: 27)	Q42K, E223S
pms1723 (SEQ ID NO: 28)	Q42K, E223S, A392D
pms2104 (SEQ ID NO: 29)	Q42K, R88L, E223A, T235R, Q311P, A392D
pms2118 (SEQ ID NO: 34)	Q42K, R88L, S205L, E223S, T235R, Q240E, Q311P, A392D, S409E
pms2124 (SEQ ID NO: 31)	Q42K, R88L, S205L, E223K, T235R, Q240E, Q311P, A392D, S409E
pms1284 (SEQ ID NO: 23)	T235R, Q311P
pms1286 (SEQ ID NO: 22)	T235R
pms1290 (SEQ ID NO: 24)	T235K
pms465 (SEQ ID NO: 18)	E223S
pms1042 (SEQ ID NO: 19)	Q311P
pms1153 (SEQ ID NO: 21)	R88L
pms1484 (SEQ ID NO: 25)	S205L
pms1579 (SEQ ID NO: 26)	S409E
pms2138 (SEQ ID NO: 30)	Q42K, R88L, S205L, E223S, T235R, Q311P, A392D
pms2177 (SEQ ID NO: 32)	N34Q, Q42K, R88L, S205L, E223K, T235R, Q240E, Q311P, A392D, S409E
pms2178 (SEQ ID NO: 33)	Q42K, R88L, G100Q, S205L, E223K, T235R, Q240E, Q311P, A392D, S409E
pms1776 (SEQ ID NO: 12)	Q42K, R88L, E223S, T235R, Q311P, A392D
pms1934 (SEQ ID NO: 13)	Q42K, R88L, E223K, T235R, H272D, Q311P, A392D
pms2020 (SEQ ID NO: 14)	Q42K, R88L, E223S, T235R, Q311P, A392D, S409E
pms2022 (SEQ ID NO: 15)	Q42K, R88L, S205L, E223S, T235R, Q311P, A392D, S409E
pms2062 (SEQ ID NO: 16)	Q42K, R88L, S205L, E223K, Q240E, T235R, Q311P, A392D, S409E
pms2171 (SEQ ID NO: 17)	Q42K, R88L, S205L, E223A, T235R, Q311P, A392D, S409E

20 Las variantes de polipéptidos definidas en la presente pueden tener una termoestabilidad alterada, una actividad de endo-amilasa alterada, una actividad de exo-amilasa alterada, y/o una relación alterada de actividad de exo- a endo-

amilasa en comparación con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 10. En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente tiene un mejor efecto antienvjecimiento en comparación con la amilasa de la SEQ ID NO: 1. En otro aspecto, los polipéptidos definidos en la presente tienen una mejor termoestabilidad en comparación con la amilasa de la SEQ ID NO: 1.

- 5 Las variantes de polipéptidos definidas en la presente pueden tener hasta 25, 23, 21, 19, 17, 15, 13, 11, 9, 8, 7, 6, 5 supresiones, adiciones, inserciones o sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

La presente descripción también se refiere a cada uno y todo el esqueleto de G4-amilasa que tiene la SEQ ID NO: 2, 4, 6 u 8 que comprende las sustituciones definidas adicionalmente en la presente.

- 10 También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican las variantes de polipéptidos anteriores. En una forma de realización, un ácido nucleico que codifica una variante del polipéptido definida en la presente es una secuencia de nucleótidos que codifica la proteínas que comprende una secuencia de aminoácidos de residuos 1-429 de la SEQ ID NO: 1 expuesta en la SEQ ID NO: 52. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 3 codifica el esqueleto de la G4 amilasa con SEQ ID NO: 2. Como es bien entendido por los expertos en la técnica, el código genético está degenerado, lo que significa que múltiples codones en algunos casos pueden codificar el mismo aminoácido ácido. Los ácidos nucleicos pueden incluir el ADN genómico, ARNm, y ADNc que codifica una variante de polipéptido
- 15

### 2.1. Caracterización de la variante del polipéptido

- Las variantes de la enzima se pueden caracterizar por sus secuencias de ácidos nucleicos y polipéptidos primaria, mediante el modelado estructural tridimensional, y/o por su actividad específica. Las características adicionales de las variantes de polipéptidos tal como se definen en la presente incluyen por ejemplo, estabilidad, rango de pH, estabilidad a la oxidación, y termoestabilidad. Los niveles de expresión y actividad de la enzima se pueden evaluar usando ensayos estándares conocidos por los expertos en este campo. En otro aspecto, las variantes demuestran características de rendimiento mejorado en relación con el polipéptido con la SEQ ID NO: 1, tales como una mejor estabilidad a altas temperaturas, por ejemplo, 65-85°C. En un aspecto, las variantes de polipéptidos definidas en la presente son ventajosas para usar en la licuefacción u otros procesos que requieren temperaturas elevadas, tales como el horneado. Por ejemplo, una variante de polipéptido termoestable definida en la presente puede degradar el almidón a temperaturas de aproximadamente 55°C a aproximadamente 85°C o más.
- 20
- 25

- Una característica de expresión significa un nivel alterado de expresión de la variante, cuando la variante se produce en una célula huésped particular. La expresión se refiere en general a la cantidad de variante activa que es recuperable a partir de un caldo de fermentación utilizando técnicas estándares en la materia, durante un período de tiempo dado. La expresión también se puede referir a la cantidad o tasa de variante producida dentro de la célula huésped o secretada por la célula huésped. La expresión también se puede referir a la tasa de traducción del ARNm que codifica la variante de la enzima.
- 30

- Se proporciona un ácido nucleico complementario a un ácido nucleico que codifica cualquiera de las variantes de polipéptido definidas en la presente expuestas en la presente. Adicionalmente, se proporciona un ácido nucleico capaz de hibridar con el complemento. En otra forma de realización, la secuencia para su uso en los métodos y composiciones descritos en la presente es una secuencia sintética. Incluye, pero sin limitación, las secuencias obtenidas con el uso óptimo de codones para la expresión en organismos huésped, tales como levaduras.
- 35

### 3. Producción de las variantes de polipéptidos definidas en la presente

- Las variantes de polipéptidos provistas en la presente se pueden producir sintéticamente o mediante expresión recombinante en una célula huésped, de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. La variante de polipéptido expresada definida en la presente opcionalmente se aísla antes de su uso. En otra forma de realización, variante del polipéptido definida en la presente se purifica después de la expresión. Se describen los métodos de modificación genética y la producción recombinante de variantes de polipéptido, por ejemplo, en las patentes U.S. Nros 7.371.552, 7.166.453; 6.890.572; y 6.667.065; y Solicitudes publicadas U.S. Nros 2007/0141693; 2007/0072270; 2007/0020731; 2007/0020727; 2006/0073583; 2006/0019347; 2006/0018997; 2006/0008890; 2006/0008888; y 2005/0137111. Las enseñanzas pertinentes de estas descripciones, que incluyen las secuencias de polinucleótidos que codifican el polipéptido, cebadores, vectores, métodos de selección, células huésped, purificación y reconstitución de variantes de polipéptidos expresadas y la caracterización de variantes de polipéptidos definidas en la presente, que incluyen tampones útiles, rangos de pH, concentraciones de Ca<sup>2+</sup>, concentraciones de sustrato y concentraciones de enzima para ensayos enzimáticos, se incorporan en la presente.
- 40
- 45
- 50

- En otra forma de realización, las células huésped adecuadas incluyen una bacteria Gram positiva seleccionada del grupo que consiste en Bacillus subtilis, B. licheniformis, B. lentus, B. brevis, B. stearothermophilus, B. alkalophilus, B. amiloliquefaciens, B. coagulans, B. circulans, B. lautus, B. thuringiensis, Streptomyces lividans, o S. murinus; o una bacteria Gram negativa, donde dicha bacteria Gram negativa es una especie Escherichia coli o Pseudomonas. En un aspecto, la célula huésped es una B. subtilis o B. licheniformis. En una forma de realización, la célula huésped es B. subtilis, y la proteína expresada se manipula genéticamente para comprender una secuencia señal de B.
- 55

subtilis, que se exponen con mayor detalle a continuación. En un aspecto, la célula huésped expresa el polinucleótido expuesto en las reivindicaciones.

En algunas formas de realización, una célula huésped se manipula genéticamente para expresar una variante del polipéptido definida en la presente con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 78%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con el polipéptido de la SEQ ID NO:1. En algunas formas de realización, el polinucleótido que codifica una variante del polipéptido definida en la presente tendrá una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos aproximadamente 78%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un ácido nucleico que codifica la proteína de la SEQ ID NO: 1. En una forma de realización, la secuencia de ácidos nucleicos tiene al menos aproximadamente 78%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con el ácido nucleico de la SEQ ID NO: 52.

### 3.1. Vectores

En un aspecto, la invención se refiere a un vector que comprende un polinucleótido. En un aspecto, de la invención una célula bacteriana comprende el vector. En algunas formas de realización, un constructo de ADN que comprende un ácido nucleico que codifica una variante se transfiere a una célula huésped en un vector de expresión que comprende secuencias reguladoras unidas operativamente a una secuencia codificadora. El vector puede ser cualquier vector que puede ser integrado en un genoma de la célula huésped fúngica y se replica cuando se introduce en la célula huésped. El catálogo de FGSC de cepas de la Universidad de Missouri, enumera vectores adecuados. Los ejemplos adicionales de vectores de expresión y/o vectores de integración adecuados se proporcionan en Sambrook et al, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (2001); Bennett et al., MORE GENE MANIPULATIONS IN FUNGI, Academic Press, San Diego (1991), pp. 396-428 y la patente U.S, N°. 5.874.276. Los ejemplos de vectores incluyen pFB6, pBR322, PUC18, pUC100 y pENTR/D, pDON™201, pDONR™221, pENTR™, pGEM®3Z y pGEM®4Z. Los ejemplos para usar en las células bacterianas incluyen pBR322 y pUC19, que permiten la replicación en E. coli, y pE194, por ejemplo, que permite la replicación en Bacillus.

En algunas formas de realización, un ácido nucleico que codifica una variante está unido operativamente a un promotor adecuado, que permite la transcripción en la célula huésped. El promotor puede derivar de genes que codifican proteínas homólogas o heterólogas a la célula huésped. Los ejemplos adecuados no limitantes de promotores incluyen promotores cbh1, cbh2, egl1, y egl2. En una forma de realización, el promotor es uno que es nativa de la célula huésped. Por ejemplo, cuando P. saccharophila es el huésped, el promotor es un promotor de P. saccharophila P nativo. Un "promotor inducible" es un promotor que es activo bajo regulación ambiental o de desarrollo. En otra forma de realización, el promotor es uno que es heterólogo para la célula huésped.

En algunas formas de realización, la secuencia codificadora está unida operativamente a una secuencia de ADN que codifica una secuencia señal. Un péptido señal representativo es la SEQ ID NO: 11, que es la secuencia señal nativa del precursor de PS4. En otras realizaciones, el ADN que codifica la secuencia señal se reemplaza con una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal de una especie distinta de P. saccharophila. En esta forma de realización, el polinucleótido que codifica la secuencia señal está inmediatamente corriente arriba y en marco del polinucleótido que codifica el polipéptido. La secuencia de señal se puede seleccionar de la misma especie que la célula huésped. En un ejemplo no limitante, la secuencia señal es una secuencia señal de ciclodextrina glucanotransferasa. (CGTasa; EC 2.4.1.19) de Bacillus sp, y las variantes de polipéptidos descritas en la presente se expresan en una célula huésped de B. subtilis. Un residuo de metionina se puede añadir al extremo N-terminal de la secuencia señal.

En algunas formas de realización, una secuencia de señal y una secuencia de promotor que comprende un constructo de ADN o vector para introducir en una célula huésped fúngica derivan de la misma fuente. En algunas realizaciones, el vector de expresión también incluye una secuencia de terminación. En una forma de realización, la secuencia de terminación y la secuencia promotora se derivan de la misma fuente. En otra forma de realización, la secuencia de terminación es homóloga a la célula huésped.

En algunas realizaciones, un vector de expresión incluye un marcador seleccionable. Los ejemplos de marcadores seleccionables adecuados incluyen los que confieren resistencia a los agentes antimicrobianos, por ejemplo, higromicina o fleomicina. Los marcadores selectivos nutricionales también son adecuados e incluyen amdS, argB, y pyr4. En una forma de realización, el marcador selectivo es el gen amdS, que codifica la enzima acetamidasa que permite a las células transformadas crecer en acetamida como fuente de nitrógeno. El uso de un gen amdS de A. nidulans como marcador selectivo se describe en Kelley et al, EMBO J. 4.: 475-479 (1985) y Penttila et al, Gene 61: 155-164 (1987).

Un vector de expresión adecuado que comprende un constructo de ADN con un polinucleótido que codifica una variante puede ser cualquier vector que es capaz de replicarse de forma autónoma en un organismo huésped dado o integrarse en el ADN del huésped. En algunas realizaciones, el vector de expresión es un plásmido. En algunas formas de realización, se contemplan dos tipos de vectores de expresión para obtener la expresión de genes. El primer vector de expresión comprende secuencias de ADN en el que el promotor, la región codificadora y el

terminador se originan a partir del gen para expresar. En algunas realizaciones, el truncamiento de genes se obtiene mediante la supresión de las secuencias de ADN no deseadas, por ejemplo, ADN que codifica el dominio de unión a almidón-C-terminal, para dejar que el dominio se exprese bajo el control de sus propias secuencias reguladoras de transcripción y traducción. El segundo tipo de vector de expresión se preensambla y contiene secuencias necesarias para la transcripción de alto nivel y un marcador seleccionable. En algunas realizaciones, la región codificadora para un gen o parte de este se inserta en este vector de expresión de uso general, de modo que está bajo el control transcripcional de las secuencias promotoras y de terminación del constructo de expresión. En algunas realizaciones, los genes o parte de estos se insertan corriente abajo del promotor cbh1 fuerte.

### 3.2. Transformación, expresión y cultivo de las células huésped

La introducción de un constructo de ADN o vector en una célula huésped incluye técnicas tales como la transformación; electroporación; microinyección nuclear; transducción; transfección, por ejemplo, transfección mediada por lipoinfección y mediada por DEAE-Dextrina; incubación con precipitado de ADN con fosfato de calcio; bombardeo de alta velocidad con microproyectiles recubiertos de ADN; y fusión de protoplastos. Las técnicas de transformación general son conocidas en la materia. Ver, por ejemplo, Ausubel et al. (1987), supra, capítulo 9; Sambrook et al. (2001), supra; y Campbell et al., Curr. Genet. 16: 53-56 (1989). La expresión de la proteína heteróloga en *Trichoderma* se describe, por ejemplo, en la Patente U.S. N.º 6.022.725; Patente U.S. N.º 6.268.328; Harkki et al., Enzyme Microb. Technol. 13: 227-233 (1991); Harkki et al., Biotechnol. 7: 596-603 (1989); EP 244.234; y EP 215,594. En una forma de realización, los transformantes genéticamente estables se construyen con sistemas de vectores mediante el cual el ácido nucleico que codifica una variante está integrado de manera estable en un cromosoma de la célula huésped. Los transformantes se purifican luego mediante técnicas conocidas.

En un ejemplo no limitante, los transformantes estables, que incluyen un marcador de *amdS* se distinguen de los transformantes inestables por su velocidad de crecimiento más rápida y la formación de colonias circulares con un contorno regular más que irregular en medio de cultivo sólido que contiene acetamida. Además, en algunos casos, se lleva a cabo una prueba adicional de la estabilidad mediante el cultivo de los transformantes en un medio no selectivo sólido, por ejemplo, un medio que carece de acetamida, recolección de las esporas de este medio de cultivo y la determinación del porcentaje de estas esporas que posteriormente germinarán y crecerán en medio selectivo que contiene acetamida. Se pueden usar otros métodos conocidos en la técnica para seleccionar transformantes.

### 3.3. Identificación de la actividad

Para evaluar la expresión de una variante en una célula huésped, los ensayos pueden medir la proteína expresada, ARNm correspondiente, o la actividad amilasa. Por ejemplo, los ensayos apropiados incluyen transferencia Northern y Southern, RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa), y la hibridación in situ, utilizando una sonda de hibridación marcada apropiadamente. Los ensayos adecuados también incluyen actividad de medición en una muestra. Los ensayos adecuados de la exo-actividad de la variante incluyen, pero sin limitación, el ensayo Betamyl® (Megazyme, Irlanda). Los ensayos adecuados de la endo-actividad de la variante incluyen, pero sin limitación, el ensayo de azul Phadebas (Pharmacia y Upjohn Diagnostics AB). Los ensayos también incluyen el análisis de HPLC de licuefactos preparado en presencia de la variante. Se puede usar HPLC para medir la actividad de la amilasa mediante la separación de los sacáridos DP-3 y DP-4 de otros componentes del ensayo.

#### Propiedades de manipulación mejoradas

Las variantes de polipéptidos descritas en la presente con preferencia, con preferencia propiedades de horneado mejoradas. Por lo tanto, las variantes de polipéptidos tienen propiedades mejoradas cuando se compara con la SEQ ID NO:1, tales como una o más de termoestabilidad mejorada, estabilidad al pH mejorada, o exo-especificidad mejorada. Las variantes de polipéptidos descritas en la presente con preferencia también tienen mejores propiedades de manipulación, de modo que un producto alimenticio tratado con una variante de polipéptido tiene una o todas de firmeza inferior, elasticidad mayor, cohesión mayor, friabilidad inferior o mayor capacidad de plegado en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con la SEQ ID NO: 1.

Sin desear estar ligado a ninguna teoría en particular, se considera que las mutaciones en las posiciones particulares tienen efectos individuales y acumulados sobre las propiedades de un polipéptido que comprende dichas mutaciones.

#### Termoestabilidad y estabilidad al pH

Con preferencia, la variante de polipéptido es termoestable; con preferencia, tiene mayor termoestabilidad que la SEQ ID NO: 1.

En el trigo y otros cereales las cadenas laterales externas de amilopectina están en el rango de 12-19 DP. Por lo tanto, la hidrólisis enzimática de las cadenas laterales de amilopectina, por ejemplo, mediante variantes de polipéptidos descriptos que tienen actividad de exoamilasa no maltogénica, puede reducir marcadamente sus tendencias de cristalización.



El almidón en el trigo y otros cereales que se utilizan para fines de horneado está presente en la forma de gránulos de almidón que generalmente son resistentes al ataque enzimático por las amilasas. Por lo tanto la modificación del almidón se limita principalmente al almidón dañado y progresa muy lentamente durante la elaboración de la masa y horneado inicial hasta que la gelatinización comienza a aproximadamente 60°C. Como consecuencia de esto solamente las amilasas con un alto grado de termoestabilidad son capaces de modificar el almidón de manera eficiente durante el horneado. Y, en general la eficiencia de amilasas se incrementa con el aumento de la termoestabilidad. Esto es así porque cuanto más termoestable es la enzima puede estar activa más tiempo durante el horneado y por lo tanto proporcionará más efecto antienvjecimiento.

Por consiguiente, el uso de polipéptidos variantes como se describe en la presente cuando se añade al almidón en cualquier etapa de su procesamiento en un producto alimenticio, por ejemplo, antes, durante o después del horneado en pan puede retardar o impedir o lentificar la retrogradación. Tal uso se describe con más detalle a continuación.

Como se usa en la presente, el término "termoestable" se refiere a la capacidad de la enzima para conservar la actividad después de la exposición a temperaturas elevadas. Con preferencia, la variante de polipéptido es capaz de degradar almidón a temperaturas de aproximadamente 55°C a aproximadamente 80°C o más. Convenientemente, la enzima conserva su actividad después de la exposición a temperaturas de hasta aproximadamente 95°C.

La termoestabilidad de una enzima tal como una exoamilasa no maltogénica se mide por su vida media. En consecuencia, las variantes de polipéptidos descritas en la presente tienen vidas medias extendidas con respecto a la enzima original con preferencia en 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200% o más, con preferencia a temperaturas elevadas de 55°C a aproximadamente 95°C o más, con preferencia a aproximadamente 80°C.

Como se usa en la presente, la vida media ( $t_{1/2}$ ) es el tiempo (en minutos) durante el cual se inactiva la mitad de la actividad de la enzima en condiciones de calor definidas. En formas de realización preferidas, la vida media se ensaya a 80 grados C, con preferencia; la muestra se calienta durante 1-10 minutos a 80°C o superior. El valor de la vida media luego se calcula mediante la medición de la actividad de la amilasa residual, por cualquiera de los métodos descritos en la presente. Con preferencia, se lleva a cabo un ensayo de la vida media como se describe en más detalle en los Ejemplos.

Con preferencia, las variantes de polipéptidos descritas en la presente son activas durante el horneado e hidrolizan el almidón durante y después de la gelatinización de los gránulos de almidón que empieza a temperaturas de aproximadamente 55 grados C. Cuanto más termoestable es la exoamilasa no maltogénica más tiempo puede ser activa y por lo tanto proporcionará más efecto antienvjecimiento. Sin embargo, durante el horneado a temperaturas por encima de aproximadamente 85 grados C, se puede producir la inactivación de la enzima. Si esto sucede, la exoamilasa no maltogénica se puede inactivar gradualmente de modo que no hay sustancialmente actividad después del proceso de horneado en el pan final. Por lo tanto, con preferencia, las exoamilasas no maltogénicas adecuadas para su uso como se ha descrito tienen una temperatura óptima por encima de 50 grados C y por debajo de 98 grados C.

La termoestabilidad de las variantes de polipéptidos descritas en la presente se pueden mejorar mediante el uso de manipulación genética de proteínas para ser más termoestable y por lo tanto más adecuadas para los usos descritos en la presente; por lo tanto está abarcado el uso de variantes de polipéptidos modificadas para ser más termoestables mediante la manipulación genética de proteínas .

Con preferencia, la variante de polipéptido es estable al pH; con más preferencia, tiene una mayor estabilidad al pH que la SEQ ID NO: 1. Como se usa en la presente el término "estable al pH" se refiere a la capacidad de la enzima para conservar la actividad en un amplio rango de pH. Con preferencia, la variante de polipéptido es capaz de degradar el almidón a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 10,5. En una forma de realización, el grado de estabilidad del pH se puede ensayar midiendo la vida media de la enzima en condiciones de pH específicas. En otra forma de realización, el grado de estabilidad al pH se puede ensayar midiendo la actividad o la actividad específica de la enzima en condiciones de pH específicas. Las condiciones de pH específicos pueden ser cualquier pH desde pH 5 a pH 10,5.

En consecuencia, la variante de polipéptido puede tener una vida media más larga o una actividad más alta (de acuerdo con el ensayo) cuando se compara con la SEQ ID NO: 1 en condiciones idénticas. Las variantes de polipéptidos pueden tener 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200% o vida media más larga en comparación con la SEQ ID NO: 1 en condiciones de pH idénticas. De forma alternativa o adicional pueden tener mayor actividad cuando se compara con la SEQ ID NO:1 en condiciones de pH idénticas.

#### Exoespecificidad

Se sabe que algunas exoamilasas no maltogénicas pueden tener algún grado de actividad endoamilasa. En algunos casos, puede ser necesario reducir o eliminar este tipo de actividad ya que la actividad endoamilasa posiblemente puede afectar negativamente a la calidad del producto de pan final mediante la producción de una miga pegajosa o gomosa debido a la acumulación de dextrinas ramificadas.

La exoespecificidad se puede medir útilmente mediante la determinación de la relación de actividad de amilasa total a actividad de endo-amilasa total. Esta relación se denomina en este documento como un "Índice de exoespecificidad". En formas de realización preferidas, una enzima se considera una exoamilasa si tiene un índice de exoespecificidad de 20 o más. Es decir, su actividad de amilasa total (que incluye la actividad de exo-amilasa) es 20 veces o más grande que su actividad de endoamilasa. En formas de realización muy preferidas, el índice de exoespecificidad de las exoamilasas es 30 o más, 40 o más, 50 o más, 60 o más, 70 o más, 80 o más, 90 o más, o 100 o más. En formas de realización muy preferidas, el índice de exoespecificidad es 150 o más, 200 o más, 300 o más, 400 o más, 500 o más o 600 o más.

La actividad de la amilasa total y la actividad de endoamilasa se pueden medir por cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, la actividad total de amilasa se puede medir mediante el ensayo el número total de extremos reductores liberados de un sustrato de almidón. Alternativamente, el uso de un ensayo de Betamyl se describe con más detalle en los ejemplos, y por conveniencia, la actividad amilasa analizada en los Ejemplos se describe en términos de "unidades de Betamyl" en las Tablas.

La actividad de endoamilasa se puede analizar mediante el uso de un kit de Phadebas (Pharmacia y Upjohn). Este emplea un almidón reticulado marcado con azul (marcado con un colorante azoico); sólo cortes internos de la molécula de almidón liberan la marca, mientras que los cortes externos no lo hacen. La liberación de colorante se puede medir por espectrofotometría. En consecuencia, el kit Phadebas mide la actividad de endoamilasa, y por conveniencia, los resultados de tal ensayo se denominan en este documento como "unidades Phadebas".

En una forma de realización muy preferida, en consecuencia el índice de exoespecificidad se expresa en términos de unidades Betamil /unidades Phadebas, también denominadas como "B/Phad".

La exoespecificidad también se puede analizar de acuerdo con los métodos descritos en la técnica anterior, por ejemplo, en nuestra Publicación de patente Internacional número WO99/50399. Esto mide exoespecificidad por medio de una relación entre la actividad endoamilasa a la actividad exoamilasa. Por lo tanto, en un aspecto preferido, la variante de polipéptido descrita en la presente tendrá menos de 0,5 unidades de endoamilasa (EAU) por unidad de actividad exoamilasa. Con preferencia, las exoamilasas no maltogénicas que son adecuadas para uso de acuerdo con la presente invención tienen menos de 0,05 EAU por unidad de actividad exoamilasa y con más preferencia menos de 0,01 EAU por unidad de actividad exoamilasa.

La variante de polipéptido descrita en la presente con preferencia tendrá exoespecificidad, por ejemplo, medida por los índices de exoespecificidad, descritos anteriormente, en forma compatible con las exoamilasas. Además, con preferencia tiene o mayor o aumento de exoespecificidad cuando se compara con la SEQ ID NO:1. En consecuencia, por ejemplo, la variante de polipéptido puede tener 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200% o mayor índice de exoespecificidad cuando se compara con la SEQ ID NO:1, con preferencia en condiciones idénticas. Pueden tener 1,5x o superior, 2x o superior, 5 x o superior, 10 x o superior, 50 x o superior, 100 x o superior, cuando se compara con la SEQ ID NO:1, con preferencia en condiciones idénticas.

### 3.4. Métodos para purificar variantes

En general, una variante producida en cultivo celular es secretada en el medio y puede ser purificado o aislado, por ejemplo, mediante la eliminación de componentes no deseados del medio de cultivo celular. En algunos casos, una variante se puede recuperar a partir de un lisado celular. En tales casos, la enzima se purifica a partir de las células en las que se produjo usando técnicas de rutina empleados por los expertos en la técnica. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, cromatografía de afinidad, métodos cromatográficos de intercambio de iones, que incluyen intercambio iónico de alta resolución, cromatografía de interacción hidrofóbica, partición de dos fases, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice o una resina de intercambio catiónica tal como DEAE, cromatofluore, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio, y filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75.

## 4. Composiciones y usos de variantes

Una variante de polipéptido producido y purificado por los métodos descritos anteriormente es útil para una variedad de aplicaciones industriales. En una forma de realización, la variante de polipéptido definida en la presente es útil en un proceso de conversión de almidón, particularmente en un proceso de licuefacción de un almidón, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo o almidón de cebada. El producto final deseado puede ser cualquier producto que puede ser producido por la conversión enzimática del sustrato de almidón. Por ejemplo, el producto deseado puede ser un jarabe rico en sacáridos útiles para la fermentación, en particular maltotriosa, glucosa y/o maltosa. El producto final luego se puede utilizar directamente en un proceso de fermentación para producir alcohol para combustible o potable (es decir, alcohol potable). El experto en la materia es consciente de las diversas condiciones de fermentación que se pueden usar en la producción de etanol u otros productos finales de fermentación. Un organismo microbiano capaz de fermentar maltotriosas y/o azúcares menos complejos, tales como *S. cerevisiae* o una variante modificada genéticamente de esta es particularmente útil. Las variantes alteradas genéticamente adecuadas de *S. cerevisiae* particularmente útiles para la fermentación maltotriosas incluyen variantes que expresan AGT1 permeasa (Stambuck et al., Lett. Appl. Microbiol. 43: 370-76 (2006)), MTT1 y MTT1alt (Dietvorst et al., Yeast

22: 775-88 (2005)), o MAL32 (Dietvorst et al., Yeast 24: 27-38 (2007)). Las presentes variantes de polipéptidos también son útiles en composiciones y métodos de preparación de los alimentos, cuando se desean, enzimas que expresan actividad de la amilasa a altas temperaturas.

5 La conveniencia de utilizar una variante de polipéptido particular dependerá de las propiedades generales mostradas por la variante de polipéptido con respecto a los requerimientos de una aplicación particular. Como cuestión general, las variantes de polipéptido útiles para un proceso de conversión de almidón tienen actividad de endo-amilasa sustancial en comparación con PS4 de tipo salvaje o SEQ ID NO: 1, y/o tienen una actividad exo a endo-amilasa inferior en comparación con PS4 tipo salvaje o SEQ ID NO: 1. Tales variantes de polipéptidos pueden ser particularmente útiles en un proceso de licuefacción, cuando se usa solo o en combinación con otras variantes de amilasa, en donde la escisión interna de los sacáridos de ramificación complejos reduce la viscosidad del sustrato. Se espera que algunas variantes de polipéptidos útiles para la licuefacción, sin embargo, tengan una actividad de endo-amilasa comparable o incluso menores que PS4 tipo salvaje. Las variantes de polipéptidos útiles incluyen los que tienen más o menos la actividad exo-amilasa del polipéptido de PS4 de tipo salvaje o la SEQ ID NO: 1, de acuerdo con la aplicación. Las composiciones pueden incluir uno o una combinación de variantes de amilasa, cada una de las cuales puede mostrar un conjunto diferente de propiedades.

#### 4.1. Preparación de los sustratos de almidón

Los expertos en la técnica son muy conscientes de los métodos disponibles que se pueden usar para preparar sustratos de almidón para su uso en los procesos descritos en la presente. Por ejemplo, un sustrato de almidón útil se puede obtener de tubérculos, raíces, tallos, leguminosas, cereales o grano entero. Más específicamente, el almidón granular viene de las plantas que producen altas cantidades de almidón. Por ejemplo, el almidón granular se puede obtener a partir de maíces, mazorcas, trigo, cebada, centeno, mijo, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, arroz, arvejas, porotos, bananas o papas. El maíz contiene aproximadamente 60 a 68% de almidón; la cebada contiene aproximadamente 55-65% de almidón; el mijo contiene aproximadamente de 75 a 80% de almidón; el trigo contiene aproximadamente 60 a 65% de almidón; y el arroz pulido contiene almidón de 70-72%. Los sustratos de almidón específicamente contemplados son almidón de maíz, almidón de trigo y almidón de cebada. El almidón de un grano puede estar molido o entero e incluye sólidos de maíz, tales como granos, salvado y/o mazorcas. El almidón puede ser almidón altamente refinado en bruto o materia prima a partir de procesos de la refinera de almidón. Diversos almidones también están disponibles en el comercio. Por ejemplo, el almidón de maíz está disponible en Cerestar, Sigma, y Katayama Chemical Industry Co. (Japón); almidón de trigo está disponible de Sigma; almidón de batata está disponible en Wako Pure Chemical Industry Co. (Japón); y almidón de papa está disponible en Nakaari Química Pharmaceutical Co. (Japón).

Las maltodextrinas son útiles como sustratos de almidón en las formas de realización de la presente invención. Las maltodextrinas comprenden productos de hidrólisis del almidón que tienen aproximadamente 20 o menos unidades de dextrosa (glucosa). Las maltodextrinas comerciales típicas contienen mezclas de polisacáridos que incluyen de aproximadamente tres a aproximadamente diecinueve unidades de dextrosa ligadas. Las maltodextrinas son definidas por la FDA como productos que tienen una equivalencia de dextrosa (DE) de menos de 20. Por lo general, se reconocen como ingredientes de alimentos (GRAS) seguros para el consumo humano. La equivalencia de dextrosa (DE) es una medición de energía reductora en comparación con un estándar de dextrosa (glucosa) de 100. Cuanto mayor es la DE, mayor es el grado de despolimerización del almidón, lo que produce un tamaño de polímero promedio menor (polisacárido), y mayor la dulzura. Una maltodextrina particularmente útil se MALTRIN® M040 obtenida a partir de almidón de maíz, disponible de Grain Processing Corp. (Muscatine, Iowa): DE 4.0-7.0; densidad aparente de 0,51 g/cc; contenido de agua medido al 6,38% en peso.

El sustrato de almidón puede ser un almidón crudo de grano entero molido, que contiene fracciones no de almidón, por ejemplo, residuos de germen y fibras. La molienda puede comprender molienda húmeda o molienda en seco. La molienda en húmedo, el grano entero se sumerge en agua o ácido diluido para separar el grano en sus partes componentes, fibras, por ejemplo, almidón, proteínas, germen, aceite, fibras de grano. La molienda en húmedo separa de manera eficiente el germen y la harina (es decir, gránulos de almidón y proteína) y es especialmente adecuado para la producción de jarabes. En la molienda en seco, los granos enteros se muelen en un polvo fino y se procesan sin fraccionar el grano en sus partes componentes. El grano molido en seco de este modo comprenderá cantidades significativas de compuestos de carbohidratos no amiláceos, además de almidón. La mayor parte de etanol proviene de la molienda en seco. Alternativamente, el almidón para procesar puede ser una calidad de almidón altamente refinado, por ejemplo, al menos aproximadamente 90%, al menos 95%, al menos 97%, o al menos 99,5% de pureza.

#### 4.2. Sacarificación, gelatinización y licuefacción del almidón

55 Como se usa en la presente, el término "licuefacción" o "licuar" significa un proceso mediante el cual el almidón se convierte en dextrinas de cadena más cortas y menos viscosas. Este proceso implica la gelatinización del almidón de manera simultánea con o seguida de la adición de una variante de polipéptido descrito en la presente. Una variante de polipéptido termoestable descrita en la presente con preferencia se usa para esta aplicación. Se puede añadir opcionalmente enzimas inductoras de licuefacción adicionales.

En algunas formas de realización, el sustrato de almidón o maltodextrina preparada como se describió anteriormente se suspende con agua. La suspensión almidón o maltodextrina puede contener almidón como un por ciento en peso de sólidos secos de aproximadamente 10-55%, aproximadamente 20-45%, aproximadamente 30-45%, aproximadamente 30-40%, o, de modo opcional, aproximadamente 30-35%. Las  $\alpha$ -amilasas, por ejemplo,  $\alpha$ -amilasas bacterianas que incluyen  $\alpha$ -amilasas de Bacillus, usualmente se suministran, por ejemplo, en aproximadamente 1500 unidades por kg de materia seca de almidón. Para optimizar estabilidad y actividad de  $\alpha$ -amilasa, el pH de la suspensión se puede ajustar al pH óptimo para la variante de polipéptido usada. Se pueden añadir otras  $\alpha$ -amilasas y pueden requerir diferentes condiciones óptimas. La  $\alpha$ -amilasa bacteriana restante en la suspensión después de la licuefacción se puede desactivar mediante la reducción de pH en una etapa de reacción subsiguiente o mediante la eliminación de calcio de la suspensión.

La suspensión de almidón más la variante de polipéptido se pueden bombear de forma continua a través de un cocedor de chorro, que es calentado por vapor de aproximadamente 85°C hasta 105°C. La gelatinización se produce muy rápidamente en estas condiciones, y la actividad enzimática, combinada con las fuerzas de cizallamiento importantes, comienza la hidrólisis del sustrato de almidón. El tiempo de permanencia en el cocedor de chorro es muy breve. El almidón parcialmente gelatinizado se puede pasar en una serie de tubos de retención mantenidos a aproximadamente 85 a 105°C y se mantuvo durante aproximadamente 5 min. para completar el proceso de gelatinización. Estos tanques pueden contener deflectores para desalentar la retromezcla. Como se usa en la presente, la expresión "licuefacción secundaria" se refiere la etapa de licuefacción posterior a la licuefacción primaria, cuando la suspensión se deja enfriar a temperatura ambiente. Esta etapa de enfriamiento puede ser de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 180 minutos, por ejemplo, unos 90 minutos a 120 minutos.

Una variante del polipéptido definida en la presente se puede añadir al almidón licuado obtenido por el procedimiento anterior o a una suspensión maltodextrina en aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1,0 kg/MTDS. 1 kg/MTDS = 0,1% en peso de sólidos disueltos. En una forma de realización, un polipéptido definido en la presente se puede añadir a una suspensión de almidón o maltodextrina licuada a un nivel de tratamiento en un rango de aproximadamente 0,001% en peso a aproximadamente 0,01% en peso sobre la base de los sólidos disueltos. En una forma de realización típica, un polipéptido definido en la presente se puede añadir a una suspensión de almidón o maltodextrina licuada a un nivel de tratamiento en un rango de aproximadamente 0,0025% en peso a aproximadamente 0,01% en peso sobre la base de los sólidos disueltos. En una forma de realización,, el polipéptido definido en la presente se inmoviliza, y el sustrato de almidón o maltodextrina licuado se hace pasar sobre el polipéptido inmovilizado definido en la presente y se convierte en el producto en una reacción continua. En esta forma de realización, el polipéptido definido en la presente se puede inmovilizar con enzimas adicionales, tales como un pullulanasa.

La producción de maltotetraosa puede comprender además poner en contacto el almidón licuado u otra fuente de maltodextrinas con un isoamilasa, una proteasa, una celulasa, una hemicelulasa, una lipasa, una cutinasa, o cualquier combinación de estas.

También se proporciona un método de obtener de preparar un jarabe de sacárido (por ejemplo, maltotetraosa), que comprende añadir una variante del polipéptido definida en la presente o una composición que comprende la variante en un licuefacto de almidón y sacarificar el licuefacto de almidón para formar el jarabe de sacárido. La variante del polipéptido definida en la presente se puede añadir al licuefacto de almidón en un rango de aproximadamente 0,001% en peso a aproximadamente 0,1% en peso sobre la base de los sólidos disueltos. En una forma de realización, la variante se añade al licuefacto de almidón en un rango de aproximadamente 0,0025% en peso a aproximadamente 0,01% en peso sobre la base de los sólidos disueltos. Las unidades de concentración también se expresan en la presente como kg de variante del polipéptido por tonelada métrica de sólidos secos (MTDS), donde 1 kg/MTDS = 0,1 % en peso de sólidos disueltos. La solución de almidón licuado puede ser una suspensión de almidón licuado a aproximadamente 20-35% p/p sólidos secos. El almidón puede obtener a partir de maíces, mazorcas, trigo, cebada, centeno, mijo, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, arroz, arvejas, porotos, bananas o papas. El licuefacto de almidón se puede sacarificar a aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C tal como aproximadamente 60°C a aproximadamente 65 °C. El licuefacto de almidón se puede sacarificar a aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 7,0. Una pullulanasa, isoamilasa, pullulanasa, proteasa, celulasa, hemicelulasa, lipasa, cutinasa, o cualquier combinación de estas, se puede añadir con la variante del polipéptido al licuefacto de almidón. En una forma de realización, el jarabe de sacárido se puede fermentar para producir etanol. El jarabe de sacárido producido por el método puede comprender al menos aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, o aproximadamente 60% en peso de maltotetraosa sobre la base del contenido de sacáridos total.

En otro aspecto se proporciona un método de preparar un jarabe de sacárido, que incluye la adición de una variante del polipéptido definida en la presente y una  $\alpha$ -amilasa al almidón granular y la hidrólisis del almidón granular para formar el jarabe de sacárido. En una forma de realización, el licuefacto de almidón granular se produce mediante una  $\alpha$ -amilasa. En una forma de realización, el licuefacto de almidón granular es un licuefacto producida ácido. En una forma de realización la variante del polipéptido definida en la presente se añade al almidón granular en un rango de aproximadamente 0,001% en peso a aproximadamente 0,1% en peso sobre la base de los sólidos disueltos. En otra forma de realización la variante del polipéptido definida en la presente se añade al almidón granular en un rango de aproximadamente 0,0025% en peso a aproximadamente 0,01% en peso sobre la base de los sólidos disueltos. El

almidón granular se puede obtener almidón de maíces, mazorcas, trigo, cebada, centeno, mijo, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, arroz, arvejas, porotos, bananas o papas.

5 En una forma de realización particular el almidón granular se sacarifica a 55°C a 65°C tal como 60°C a 65°C. En otra forma de realización el almidón granular se sacarifica a pH 5,0 a pH 7,0. Se prevé que el método también puede incluir la fermentación del jarabe de sacárido para producir etanol.

10 En una forma de realización el método incluye una etapa de adición de una enzima que tiene actividad de desramificación en el almidón granular. La enzima que tiene actividad de desramificación puede incluir pero sin limitación una isoamilasa, una pululanasa, una isopululanasa, una neopululanasa o cualquiera de sus combinaciones. También se prevé que el método puede incluir opcionalmente una etapa adicional de adición de una proteasa, una celulasa, una hemicelulasa, una lipasa, una cutinasa, una pectato liasa o cualquiera de sus combinaciones al almidón granular.

15 En una forma de realización el jarabe de sacárido incluye al menos 35% en peso de maltotetraosa sobre la base del contenido de sacáridos total. De modo alternativo, el jarabe de sacárido incluye al menos 45% en peso de maltotetraosa sobre la base del contenido de sacáridos total. En otra forma de realización el jarabe de sacárido incluye al menos 50% en peso de maltotetraosa sobre la base del contenido de sacáridos total. En una forma de realización adicional el jarabe de sacárido incluye de 45% en peso a 60% en peso de maltotetraosa sobre la base del contenido de sacáridos total.

Se prevé que la variante del polipéptido definida en la presente del método puede esta inmovilizada.

20 En otro aspecto se proporciona un método para obtener IMO, que incluye la adición de a) una variante del polipéptido definida en la presente, b) una alfa-amilasa, y c) una transglucosidasa para el almidón en la forma de un licuefacto de almidón o almidón granular y sacarificar el almidón para formar IMO. Se prevé que el IMO se puede formar en un número IMO de al menos 30, al menos 40 y/o al menos 45. En una forma de realización el almidón se obtiene de maíces, mazorcas, trigo, cebada, centeno, mijo, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, arroz, arvejas, porotos, bananas o papas.

25 En otro aspecto se proporciona un método para obtener IMO, que incluye la adición de a) una variante del polipéptido, b) una alfa-amilasa, y c) una transglucosidasa al almidón en la forma de un licuefacto de almidón o almidón granular y sacarificar el almidón para formar IMO. Se puede usar cualquier número de enzimas de transglucosidasa (TG), por ejemplo, TRANSGLUCOSIDASE L-500® (Danisco US Inc., Genencor Division).

30 Se prevé que el IMO se puede formar en un número de IMO de al menos 30, al menos 40 y/o al menos 45. En una forma de realización el almidón se obtiene de maíces, mazorcas, trigo, cebada, centeno, mijo, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, arroz, arvejas, porotos, bananas o papas.

#### 4.3. Procesos de fermentación

35 La levadura típicamente de *Saccharomyces* spp. se añade a la masa y la fermentación continúa durante 24-96 horas, tal como típicamente 35 a 60 horas. La temperatura es de entre aproximadamente 26-34°C, típicamente a aproximadamente 32°C, y el pH es de aproximadamente pH 3-6, por lo general alrededor de un pH de aproximadamente 4-5.

40 En una forma de realización, un proceso de fermentación por lotes se utiliza en un sistema cerrado, en donde la composición del medio se fija al comienzo de la fermentación y no se altera durante la fermentación. Al comienzo de la fermentación, el medio se inocula con el organismo microbiano deseado. En este método, se permite que la fermentación se produzca sin la adición de ningún componente al sistema. Típicamente, una fermentación por lotes califica como un "lote" con respecto a la adición de la fuente de carbono, y a menudo se realizan intentos para controlar factores tales como el pH y la concentración de oxígeno. Las composiciones de metabolitos y biomasa del sistema por lote cambian constantemente hasta el momento que se detiene la fermentación. Dentro de los cultivos por lote, las células progresan a través de una fase de latencia estática a una fase logarítmica de crecimiento alto y finalmente a una fase estacionaria, donde la tasa de crecimiento disminuye o se detiene. Si no se trata, las células en la fase estacionaria finalmente mueren. En general, las células en fase logarítmica son responsables de la masa de producción del producto.

50 Una variación adecuada en el sistema por lote estándar es el sistema de fermentación "alimentado por lotes". En esta variación de un sistema por lote típico, el sustrato se añade en incrementos a medida que progresa la fermentación. Los sistemas de alimentación por lotes son útiles cuando la represión de catabolitos probablemente inhibe el metabolismo de las células y cuando es conveniente tener cantidades limitadas de sustrato en el medio. La medición de la concentración de sustrato real en los sistemas alimentado por lotes es difícil y por lo tanto se estima sobre la base de los cambios de factores medibles, tales como pH, oxígeno disuelto y la presión parcial de gases residuales, tales como CO<sub>2</sub>. Las fermentaciones por lotes y alimentados por lotes son bien conocidas en la técnica.

55 La fermentación continua es un sistema abierto en el que se añade un medio de fermentación definido continuamente a un biorreactor y una cantidad igual de medio acondicionado se elimina simultáneamente durante el

procesamiento. La fermentación continua mantiene generalmente los cultivos a una alta densidad constante, donde las células están principalmente en crecimiento en fase logarítmica. La fermentación continua permite la modulación de uno o más factores que afectan el crecimiento celular y/o la concentración de producto. Por ejemplo, en una forma de realización, un nutriente limitante, tal como la fuente de carbono o fuente de nitrógeno, se mantiene a una tasa fija y se permiten moderar todos los otros parámetros. En otros sistemas, un número de factores que afectan al crecimiento se puede alterar continuamente mientras que la concentración celular, medida por la turbidez media, se mantiene constante. Los sistemas continuos se esfuerzan por mantener condiciones de crecimiento de estado estacionario. Por lo tanto, la pérdida de células debido al medio que se extrae se debe equilibrar con la tasa de crecimiento celular en la fermentación. Los métodos de modulación de nutrientes y factores de crecimiento para los procesos de fermentación continuos, así como técnicas para maximizar la tasa de formación de producto, son bien conocidos en la técnica de la microbiología industrial.

Después de la fermentación, la mezcla se destila para extraer el etanol. El etanol obtenido de acuerdo con el proceso de la descripción se puede usar como, por ejemplo, etanol combustible; etanol para bebida, es decir, alcohol neutro potable o etanol industrial. El sobrante de la fermentación es el grano, que normalmente se utiliza para la alimentación animal, ya sea en forma líquida o seca. Los detalles adicionales sobre cómo llevar a cabo la licuefacción, sacarificación, fermentación, destilación, y recuperación de etanol son bien conocidos por los expertos. De acuerdo con el procedimiento de la invención, la sacarificación y la fermentación se pueden llevar a cabo simultáneamente o por separado.

#### 5. Composiciones y métodos para la preparación de panadería y alimentos

En un aspecto, las composiciones, que incluyen aditivos, productos alimenticios, productos de panadería, composiciones mejoradoras, productos de alimentación, que incluyen alimentos para animales, etc. que comprenden tales variantes alteradas que se describen en el presente, tales como las que tienen actividad exoamilasa no maltogénica, así como los métodos de obtener y usar tales polipéptidos y se proporcionan las composiciones.

Como se señaló anteriormente, las variantes de polipéptidos descritas anteriormente pueden comprender una o más propiedades de manipulación mejoradas, con preferencia propiedades de horneado mejoradas. Por lo tanto, las variantes de polipéptidos descritas anteriormente pueden proporcionar productos alimenticios así tratados tienen una o más de (con preferencia todas de) una firmeza inferior, una elasticidad superior, una cohesión superior, una friabilidad inferior o mayor capacidad de plegado. Tales propiedades de manipulación u horneado mejoradas exhibidas por los polipéptidos variantes se describen con más detalle a continuación. En un aspecto, se proporciona una variante, en la que la vida media ( $t_{1/2}$ ), con preferencia a 60 grados C, aumenta en 15% o más, con preferencia 50% o más, con máxima preferencia 100% o más, en comparación con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

En un aspecto, se proporciona una variante, como se describe en la presente, en la que un producto tratado con la variante tiene una o más, con preferencia todas las siguientes propiedades: (a) firmeza inferior; (b) elasticidad superior; (c) cohesión superior; (d) friabilidad inferior; y (e) mayor capacidad de plegado en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

En un aspecto, se proporciona una variante, como se describe en la presente, en la que la elasticidad, cohesión o capacidad de plegado del producto alimenticio aumenta de modo independiente en 15% o más, con preferencia 50% o más, con máxima preferencia 100% o más, en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

En un aspecto, se proporciona una variante, como se describe en la presente, en la que cada una de elasticidad, cohesión y capacidad de plegado de un producto alimenticio tratado con la variante está aumentada en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

En un aspecto, se proporciona una variante, como se describe en la presente, en la que la firmeza o la friabilidad del producto alimenticio disminuye de modo independiente en 15% o más, con preferencia 50% o más, con máxima preferencia 100% o más, con respecto a un producto alimenticio se ha tratado con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

En un aspecto, se proporciona una variante, como se describe en la presente, en que cada una firmeza y friabilidad de un producto alimenticio tratado con el polipéptido está disminuida en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1,

En un aspecto, se proporciona una variante, como se describe en la presente que comprende un fragmento de al menos 20 residuos de un polipéptido como se expone en las reivindicaciones, en que el polipéptido tiene actividad de exoamilasa no maltogénica.

En un aspecto, una variante, como se describe en la presente tiene actividad de exoamilasa no maltogénica. Tal actividad se puede determinar mediante los métodos descriptos en US 6.667.065.

En un aspecto, el tratamiento de los productos alimenticios, en particular masas y productos de panadería con tales polipéptidos, y de modo que los productos alimenticios exhiben las cualidades deseadas expuestas anteriormente.

5 En un aspecto, se proporciona un proceso para tratar un almidón que comprende poner en contacto el almidón con una variante, como se describe en la presente y permitir que el polipéptido genere a partir del almidón uno o más productos lineales. En un aspecto, se proporciona el uso de una variante, como se describe en la presente para preparar un producto alimenticio o alimento para animales. En un aspecto, se proporciona un proceso para preparar un producto alimenticio o alimento para animales que comprende mezclar una variante, como se describe en la presente con un ingrediente para alimentos o alimentos para animales. En un aspecto, se proporciona el uso o un proceso, en que el producto alimenticio comprende una masa o producto de masa, con preferencia un producto de masa procesado. En un aspecto, se proporciona el uso o un proceso, en que el producto alimenticio es un producto de panadería. En un aspecto, se proporciona un proceso para obtener un producto de panadería que comprende: (a) proporcionar un medio de almidón; (b) añadir al medio de almidón una variante, como se describe en la presente; y (c) aplicar calor al medio de almidón durante o después de la etapa (b) para producir un producto de panadería. En un aspecto, se proporciona un producto alimenticio, producto alimenticio para animales, producto de masa o un producto de panadería obtenido por un proceso definido en las reivindicaciones.

En un aspecto, se proporciona el uso de una variante, como se describe en la presente, en un producto de masa para retardar o reducir el envejecimiento, con preferencia retrogradación perjudicial, del producto de masa.

20 En un aspecto, se proporciona el uso de una variante, como se describe en la presente, en un producto de masa para mejorar alguna o más de firmeza, elasticidad, cohesión, friabilidad o capacidad de plegado del producto de masa.

En un aspecto, una combinación de una variante, como se describe en la presente, junto con alguna o más de los siguientes:

(a) se proporciona alfa-amilasa maltogénica también llamada glucan 1,4- $\alpha$ -maltohidrolasa (EC 3.2.1.133) de *Bacillus stearothermophilus*, o una variante, homólogo o mutantes de esta que tiene actividad de alfa-amilasa maltogénica;

25 (b) una xilanasa de panadería (EC 3.2.1.8) de por ejemplo *Bacillus* sp., *Aspergillus* sp., *Thermomyces* sp. o *Trichoderma* sp.;

(c)  $\alpha$ -amilasa (EC 3.2.1.1) de *Bacillus amiloliquefaciens* o de *Aspergillus* sp. o una variante, homólogo o mutantes de esta que tiene actividad de alfa-amilasa; y

(d) una lipasa tal como glicolipasa de *Fusarium heterosporum*.

30 Las variantes descritas en la presente con preferencia comprende una o más propiedades de manipulación mejoradas en comparación con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje, tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 ó 10, con preferencia SEQ ID NO: 1. Las propiedades de manipulación mejoradas en formas de realización preferidas pueden comprender propiedades de horneado mejoradas.

35 En consecuencia, la variante descrita en la presente en un aspecto es tal que un producto alimenticio tratado con la variante de polipéptido tiene una propiedad de manipulación mejorada o con preferencia de horneado en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 ó 10, con preferencia SEQ ID NO: 1. La propiedad de manipulación u horneado se puede seleccionar del grupo que consiste en: firmeza, elasticidad, cohesión, friabilidad y capacidad de plegado.

40 Estas propiedades de manipulación se pueden analizar mediante cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, la firmeza, elasticidad y cohesión se pueden determinar mediante el análisis de las rebanadas de pan por el análisis del perfil de textura usando por ejemplo un analizador de textura, como por ejemplo, se describe en el 11

#### Firmeza

45 Las variantes descritas en la presente están en un aspecto de modo que un producto alimenticio tratado con la variante de polipéptido tiene firmeza inferior en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 ó 10, con preferencia SEQ ID NO: 1.

La firmeza en formas de realización preferidas está inversamente correlacionada con la blandura del producto alimenticio; en consecuencia, una blandura superior puede reflejar una firmeza inferior, y viceversa.

50 La firmeza se puede medir mediante el "Protocolo de evaluación de la firmeza" expuesto en el ejemplo 11.

En un aspecto, las variantes descritas en la presente son tales que un producto alimenticio tratado con la variante de polipéptido tiene a 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200% o más firmeza inferior en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje

5 tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 ó 10, con preferencia SEQ ID NO: 1. Un producto alimenticio tratado con Las variantes de polipéptidos descritas en la presente pueden tener 1,1x, 1,5x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x o más de firmeza inferior en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 ó 10, con preferencia SEQ ID NO: 1.

#### Elasticidad

10 En un aspecto, las variantes descritas en la presente son tales que un producto alimenticio tratado con la variante de polipéptido tiene a elasticidad superior en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 ó 10, con preferencia SEQ ID NO: 1.

La elasticidad se puede medir mediante el "Protocolo de evaluación de elasticidad" expuesto en 11.

15 En consecuencia en un aspecto, las variantes descritas en la presente son tales que un producto alimenticio tratado con la variante de polipéptido tiene a 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200% o más de elasticidad superior en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 ó 10, con preferencia SEQ ID NO: 1. Un producto alimenticio tratado con la variante de polipéptido puede tener un 1,1x, 1,5x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x o más de elasticidad superior en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 ó 10, con preferencia SEQ ID NO: 1.

#### 20 Cohesión

En un aspecto, las variantes descritas en la presente son tales que un producto alimenticio tratado con la variante de polipéptido tiene cohesión superior en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 ó 10, con preferencia SEQ ID NO: 1.

25 La cohesión se puede medir mediante el "Protocolo de evaluación de cohesión" expuesto en 11.

30 En consecuencia en un aspecto, las variantes descritas en la presente son tales que un producto alimenticio tratado con la variante del polipéptido descrita en la presente tienen un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200% o más de cohesión superior en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 ó 10, con preferencia SEQ ID NO: 1. Un producto alimenticio tratado con la variante de polipéptido puede tener 1,1x, 1,5x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x o más de cohesión superior en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 ó 10, con preferencia SEQ ID NO: 1.

#### Friabilidad

35 En un aspecto, las variantes descritas en la presente son tales que un producto alimenticio tratado con la variante de polipéptido tiene friabilidad inferior en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 ó 10, con preferencia SEQ ID NO: 1.

La friabilidad se puede medir mediante el "Protocolo de evaluación de friabilidad" expuesto en el Ejemplo 13.

40 En consecuencia en un aspecto, las variantes descritas en la presente son tales que un producto alimenticio tratado con la variante de polipéptido tiene un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200% o más de friabilidad inferior en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 ó 10, con preferencia SEQ ID NO: 1. Un producto alimenticio tratado con la variante de polipéptido puede tener un 1,1x, 1,5x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x o más de friabilidad inferior en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 ó 10, con preferencia SEQ ID NO: 1.

#### Capacidad de plegado

50 En un aspecto, las variantes descritas en la presente son tales que un producto alimenticio tratado con la variante de polipéptido tiene mayor capacidad de plegado en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 ó 10, con preferencia SEQ ID NO: 1.

La capacidad de plegado con preferencia se mide mediante el "Protocolo de evaluación de la capacidad de plegado" expuesto en el Ejemplo 14.



En consecuencia, las variantes descritas en la presente son tales que un producto alimenticio tratado con la variante de polipéptido tiene un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200% o más de mayor capacidad de plegado en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 ó 10, con preferencia SEQ ID NO: 1. Un producto alimenticio tratado con la variante de polipéptido puede tener un 1,1x, 1,5x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x o más de mayor capacidad de plegado en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 ó 10, con preferencia SEQ ID NO: 1.

En un aspecto, se proporciona el uso de las variantes de polipéptidos descritas en la presente en combinación con una xilanasas para mejorar la capacidad de plegado.

Además, se proporciona un método para preparar un producto alimenticio, el método que comprende: (a) obtener una exoamilasa no maltogénica; (b) introducir una mutación en cualquiera o varias de las posiciones de la exoamilasa no maltogénica como se establece en este documento; (c) mezclar el polipéptido resultante con un ingrediente alimenticio.

Las variantes de polipéptidos se pueden usar para mejorar el volumen de productos de panadería tales como pan. Sin desear estar ligado por teoría particular alguna, se considera que esto proviene de la reducción de la viscosidad de la masa durante el calentamiento (tal como el horneado) como resultado de la amilasa que acorta las moléculas de amilosa. Esto permite que el dióxido de carbono generado por la fermentación para aumentar el tamaño del pan con menos impedimentos.

En consecuencia, los productos alimenticios que comprenden o tratar con las variantes de polipéptidos se expanden en volumen cuando se compara con productos que no se han tratado de este modo, o tratado con los polipéptidos originales tales como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 ó 10, con preferencia SEQ ID NO: 1. En otras palabras, los productos alimenticios tienen un volumen más grande aire por volumen del producto alimenticio. Alternativamente, o además, los productos alimenticios tratados con variantes de polipéptidos como se describe en la presente tienen una densidad más baja, o el peso (o masa) por relación de volumen. En formas de realización particularmente preferidas, las variantes de polipéptidos se utilizan para mejorar el volumen de pan. La mejora o expansión de volumen es beneficiosa porque reduce la gomosidad o el contenido de almidón de los alimentos. Los alimentos livianos son los preferidos por los consumidores, y la experiencia del cliente está aumentada. En formas de realización preferidas, el uso de las variantes de polipéptidos aumenta el volumen en un 10%, 20%, 30% 40%, 50% o más.

Las variantes de polipéptidos y ácidos nucleicos descritos en la presente se pueden usar como -o en la preparación de- un alimento. En particular, se pueden añadir a un alimento, es decir, como un aditivo alimentario. Se considera que el término "alimento" incluye tanto el alimento preparado, así como un ingrediente para un alimento, tal como una harina. En un aspecto preferido, el alimento es para el consumo humano. El alimento puede estar en la forma de una solución o como un sólido – de acuerdo con el uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

Las variantes de polipéptidos y ácidos nucleicos se pueden usar como un ingrediente alimentario. Como se usa en la presente, el término "ingrediente alimentario" incluye una formulación, que es o se puede añadir a los alimentos funcionales o comestibles e incluye formulaciones que se pueden usar a niveles bajos en una amplia variedad de productos que requieren, por ejemplo, acidificación o emulsión. El ingrediente alimentario puede estar en forma de una solución o como un sólido – de acuerdo con el uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

Las variantes de polipéptidos y ácidos nucleicos descritos en la presente pueden ser - o se puede añadir a - complementos alimentarios. Las variantes de polipéptidos y ácidos nucleicos descritos en la presente pueden ser - o se puede añadir a - alimentos funcionales. Como se usa en la presente, el término "alimento funcional" significa un alimento que es capaz de proporcionar no sólo un efecto nutricional y/o una satisfacción de sabor, sino que también es capaz de suministrar un efecto beneficioso adicional al consumidor. Aunque no existe una definición legal de un alimento funcional, la mayoría de las partes interesadas en esta área están de acuerdo en que son alimentos comercializados que tienen efectos sobre la salud específicos.

Las variantes de polipéptidos también se pueden usar en la fabricación de un producto alimenticio o un comestible. Los comestibles típicos incluyen productos lácteos, productos cárnicos, productos avícolas, productos de pescado y productos de masa. El producto de masa puede ser cualquier producto de masa procesada, que incluyen masas fritas, frita con aceite, asado, horneado, al vapor y hervida, tales como pan al vapor y tortas de arroz. En formas de realización muy preferidas, el producto alimenticio es un producto de panadería.

Con preferencia, el comestible es un producto de panadería. Los productos de panadería típicos (al horno) incluyen pan - tales como panes, panecillos, bollos, rosquillas, bases de pizza, etc. pastelería, pretzels, tortillas, tortas, galletitas dulces, bizcochos, galletitas saladas, etc.

Los productos alimenticios con preferencia se benefician de una o más de las propiedades de manipulación u horneado de las variantes de polipéptidos descritas en la presente. La propiedad de manipulación u horneado

mejorada se puede seleccionar del grupo que consiste en: firmeza mejorada, elasticidad mejorada, cohesión mejorada, friabilidad mejorada y capacidad de plegado mejorada.

5 Además, en un aspecto, se proporciona un método para modificar un aditivo alimentario que comprende una exoamilasa no maltogénica, el método que comprende introducir una mutación en una o más de las posiciones de la exoamilasa no maltogénica expuesto en este documento. El mismo método se puede usar para modificar un ingrediente alimenticio, o un suplemento alimenticio, un producto alimenticio, o un comestible.

En un aspecto, se proporciona el uso de variantes de polipéptidos que son capaces de retardar el revenimiento de los medios de almidón, tales como geles de almidón. Las variantes de polipéptidos son especialmente capaces de retardar la retrogradación perjudicial del almidón.

10 La mayoría de los gránulos de almidón se componen de una mezcla de dos polímeros: un contenido de amilosa esencialmente lineal y una amilopectina altamente ramificada. La amilopectina es una molécula muy grande, ramificada que consiste en cadenas de unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosilo unidas por enlaces (1-4), en el que dichas cadenas están unidas por enlaces  $\alpha$ -D-(1-6) para formar ramas. La amilopectina está presente en todos los almidones naturales, constituyendo aproximadamente el 75% de la mayoría de los almidones comunes. La amilosa es esencialmente una cadena lineal de unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosilo (1-4) ligadas que tienen pocas ramas  $\alpha$ -D-(1-6). La mayoría de los almidones contienen aproximadamente 25% de amilosa.

15 Los gránulos de almidón calentados en presencia de agua experimentan una transición de fase orden-desorden denominada gelatinización, donde el líquido es absorbido por los gránulos de hinchamiento. Las temperaturas de gelatinización varían para diferentes almidones. Después del enfriamiento del pan recién horneado la fracción de amilosa, dentro de horas, retrograda para desarrollar una red. Este proceso es beneficioso ya que crea una estructura de miga deseable con un bajo grado de firmeza y mejores propiedades de corte en rodajas. La cristalización más gradual de la amilopectina tiene lugar dentro de los gránulos de almidón gelatinizados durante los días después del horneado. En este proceso se considera que la amilopectina refuerza la red de amilosa en la que están incrustados los gránulos de almidón. Este refuerzo lleva a un aumento de la firmeza de la miga de pan. Este refuerzo es una de las principales causas de envejecimiento del pan.

20 Se sabe que la calidad de los productos horneados se deteriora gradualmente durante el almacenamiento. Como consecuencia de la recristalización del almidón (también llamada retrogradación), la capacidad de retención de agua de la miga se cambia con implicaciones importantes sobre las propiedades organolépticas y dietarias. La miga pierde suavidad y elasticidad y se vuelve firme y quebradiza. El aumento de la firmeza de la miga se utiliza a menudo como una medida del proceso de envejecimiento del pan.

25 La tasa de retrogradación perjudicial de la amilopectina depende de la longitud de las cadenas laterales de amilopectina. En consecuencia, la hidrólisis enzimática de las cadenas laterales de amilopectina, por ejemplo, mediante las variantes de polipéptidos descritas en la presente que tiene actividad de exoamilasa no maltogénica, puede reducir marcadamente sus tendencias de cristalización.

30 En consecuencia, en un aspecto, el uso de variantes de polipéptido descritos en la presente cuando se añade al almidón en cualquier fase de su transformación en un producto alimenticio, por ejemplo, antes, durante o después del horneado en pan puede retardar o impedir o lentificar la retrogradación. Tal uso se describe con más detalle a continuación.

35 En un aspecto, se proporciona un método para mejorar la capacidad de una exoamilasa no maltogénica para prevenir el envejecimiento, con preferencia la retrogradación perjudicial, de un producto de masa, el método que comprende la introducción de una mutación en cualquiera o varias de las posiciones de la exoamilasa no maltogénica expuestas en este documento.

40 Para la evaluación del efecto inhibitor del antienviejimiento de las variantes de polipéptidos, tal variante que tiene actividad de exoamilasa no maltogénica descrita en la presente, se puede medir la firmeza de la miga 1, 3 y 7 días después del horneado por medio de un Analizador de textura de alimentos universal Instron 4301 o equipo similar conocido en la técnica.

45 Otro método utilizado tradicionalmente en la técnica y que se usa para evaluar el efecto sobre la retrogradación del almidón de una variante de polipéptido tal como una variante que tiene actividad de exoamilasa se basa en DSC (calorimetría diferencial de barrido). En la presente, se mide la entalpía de fusión de la amilopectina retrogradada en miga de pan o miga de una masa del sistema modelo de masa horneada con o sin enzimas (control). El equipo de DSC aplicada puede ser una corrida de DSC 820 Mettler-Toledo con un gradiente de temperatura de 10°C por minuto, de 20 a 95°C. Para la preparación de las muestras se pesan 10 a 20 mg de miga y se transfieren a placas de aluminio Mettler-Toledo que se sellan herméticamente.

50 Las masas del sistema modelo pueden contener harina de trigo estándar y cantidades óptimas de agua o tampón con o sin la variante de polipéptido. Se mezclan en un farinógrafo Brabender 10 o 50 g durante 6 o 7 min., respectivamente. Las muestras de las masas se colocan en tubos de ensayo de vidrio (15 \* 0,8 cm) con una tapa. Estos tubos de ensayo se someten a un proceso de horneado en un baño de agua empezando con 30 min. de

incubación a 33°C seguido de calentamiento 33 a 95°C con un gradiente de 1,1 °C por minuto. y, finalmente, a 5 min. incubación a 95°C. Posteriormente, los tubos se almacenan en un termostato a 20°C antes del análisis DSC.

5 En una forma de realización, las variantes descritas en la presente tienen una entalpía de fusión reducida, en comparación con el control. En una forma de realización adicional, las variantes tienen un 10% o más de entalpía de fusión reducida. En aún otro aspecto, tienen un 20% o más, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más de entalpía de fusión reducida cuando se compara con el control.

10 En un aspecto, se proporciona el uso de variantes de polipéptidos en la preparación de los productos alimenticios, en particular, productos de almidón. El método comprende formar el producto de almidón mediante la adición de una enzima exoamilasa no maltogénica tal como una variante de polipéptido a un medio de almidón. Si el medio de almidón es una masa, a continuación, la masa se prepara mezclando harina, agua, la exoamilasa no maltogénica que es una variante de polipéptido descrita en la presente y opcionalmente otros posibles ingredientes y aditivos.

15 El término "almidón" se debe entender en el sentido de almidón per se o un componente de este, especialmente amilopectina. El término "medio de almidón" significa cualquier medio adecuado que comprende almidón. El término "producto de almidón" significa cualquier producto que contiene o se basa en o se deriva de almidón. Con preferencia, el producto de almidón contiene o se basa en o se deriva de almidón obtenido a partir de harina de trigo. El término "harina", como se usa en la presente es un sinónimo de harina finamente molida de trigo o de otro grano. Con preferencia, sin embargo, el término significa harina obtenida a partir de trigo per se y no a partir de otro grano. De este modo, y a menos que se exprese lo contrario, las referencias a "harina de trigo" como se usa en la presente con preferencia significa referencias a harina de trigo per se, así como a la harina de trigo cuando está presente en un medio, tal como una masa.

20 Una harina preferida es harina de trigo o harina de centeno o mezclas de harina de trigo y centeno. Sin embargo, también se contempla masa que comprende harina derivada de otros tipos de cereales tales como por ejemplo de arroz, maíz, cebada y durra. Con preferencia, el producto de almidón es un producto de panadería. Con más preferencia, el producto de almidón es un producto de pan. Incluso con más preferencia, el producto de almidón es un producto de panificación farináceo horneado. El término "producto de panificación farináceo horneado" se refiere a cualquier producto horneado basado en una masa obtenible mediante la mezcla de harina, agua, y un agente de fermentación en condiciones de formación de masa. Obviamente se puede añadir otros componentes a la mezcla de masa.

25 En consecuencia, si el producto de almidón es un producto de panificación farináceo horneado, el proceso entonces comprende mezclar - en cualquier orden adecuado - harina, agua, y un agente leudante en condiciones de formación de masa y además la adición de una variante de polipéptido descrita en la presente, opcionalmente en la forma de una premezcla. El agente leudante puede ser un agente leudante químico tal como bicarbonato de sodio o cualquier cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de Baker).

30 La variante de polipéptido descrita en la presente se puede añadir junto con cualquier ingrediente de la masa incluyendo la mezcla de ingredientes agua o masa o con cualquier aditivo o mezcla de aditivos. La masa se puede preparar por cualquier método de preparación de masa convencional común en la industria de panadería o en cualquier otra industria de elaboración de productos de a base de masa de harina.

35 El horneado de productos de panificación farináceos tal como por ejemplo pan blanco, pan hecho de harina centeno y harina de trigo tamizados, panecillos y similares normalmente se logra mediante el horneado de la masa de pan en las temperaturas del horno en el rango de 180 a 250°C durante aproximadamente 15 a 60 minutos. Durante el proceso de horneado un fuerte gradiente de temperatura (200-120 °C) es prevalente en las capas de masa exteriores donde se desarrolla la corteza característica del producto horneado. Sin embargo, a causa del consumo de calor debido a la generación de vapor, la temperatura en la miga es solamente cerca de 100°C al final del proceso de horneado.

40 También se proporciona un proceso para obtener un producto de pan que comprende: (a) proporcionar un medio de almidón; (b) añadir la masa de almidón una variante de polipéptido descrito en este documento; y (c) aplicar calor al medio de almidón durante o después de la etapa (b) para producir un producto de pan. Se proporciona un proceso para obtener un producto de pan que comprende añadir a un medio de almidón una variante de polipéptido descrita.

45 En un aspecto, la variante de polipéptido se puede añadir como una preparación líquida o como una composición pulverulenta seca que comprende el enzima como el único componente activo o en mezcla con uno o más ingredientes de la masa o aditivo de la masa.

50 En un aspecto adicional, se proporcionan las composiciones mejoradoras, que incluyen composiciones de mejora del pan y composiciones de mejora de la masa. Estos comprenden una variante de polipéptido, opcionalmente junto con un ingrediente adicional, o una enzima adicional, o ambos.

55

En un aspecto, se proporciona una composición mejoradora para una masa, en la que la composición mejoradora comprende una variante expuesta en cualquiera de las reivindicaciones, y al menos un ingrediente de la masa o aditivo de masa adicional.

5 En un aspecto, se proporciona una composición que comprende una harina y una variante expuesta en cualquiera de las reivindicaciones.

En un aspecto adicional, se proporciona el uso de composiciones mejoradora de pan y masa en el horneado. En un aspecto adicional, se proporciona un producto o masa horneado u obtenido de la composición mejoradora del pan o composición mejoradora de la masa. En otro aspecto, se proporciona un producto o masa horneado u obtenido mediante el uso de una composición mejoradora del pan o composición mejoradora de la masa.

10 Una masa se puede preparar mediante la mezcla de harina, agua, composición mejoradora de la masa que comprende una variante de polipéptido (como se describió anteriormente) y opcionalmente otros ingredientes y aditivos.

15 La composición mejoradora de la masa se puede añadir junto con cualquier ingrediente de la masa que incluye harina, agua u otros ingredientes o aditivos opcionales. La composición mejoradora de la masa se puede añadir antes de la harina o el agua u otros ingredientes y aditivos opcionales. La composición mejoradora de la masa se puede añadir después de la harina o el agua, o de otros ingredientes y aditivos opcionales. La masa se puede preparar por cualquier método de preparación de masa convencional común en la industria de panadería o en cualquier otra industria de elaboración de productos de a base de masa de harina

20 La composición mejoradora de la masa se puede añadir como una preparación líquida o en forma de una composición de polvo seco que comprende la composición como el único componente activo o en mezcla con uno o más de otros ingredientes o aditivos de la masa.

25 La cantidad de la variante de polipéptido que se añade normalmente está en una cantidad que se produce la presencia en la masa terminada de 50 a 100.000 unidades por kg de harina, con preferencia 100 a 50,000 unidades por kg de harina. Con preferencia, la cantidad está en el rango de 200 a 20.000 unidades por kg de harina. Alternativamente, la variante de polipéptido se añade en una cantidad que se produce la presencia en la masa terminada de 0,02 - 50 ppm de enzima basada en la harina (0,02 - 50 mg enzima por kg de harina), con preferencia 0.2 - 10 ppm.

30 En el presente contexto, 1 unidad de la exoamilasa no maltogénica se define como la cantidad de enzima que libera productos de hidrólisis equivalentes a 1  $\mu$ m ol de azúcar reductor por min cuando se incuba a 50 grados C en un tubo de ensayo con 4 ml de 10 mg de almidón de maíz ceroso ml/en MES 50 mM, cloruro de calcio 2 mM, pH 6,0 como se describe de aquí en adelante.

35 La masa tal como se describe en la presente generalmente comprende sémola de trigo o harina de trigo y/o otros tipos de sémola, harina o almidón tal como harina de maíz, almidón de maíz, harina de maíz, harina de arroz, harina de centeno, sémola de centeno, harina de avena, sémola de avena, harina de soja, sémola de sorgo, harina de sorgo, sémola de papa, harina de patata o almidón de papa. La masa puede ser fresca, congelada, o parcialmente horneada.

40 La masa puede ser una masa leudada o una masa que se debe someter al leudado. La masa se puede leudar de varias maneras, tales como mediante la adición de agentes de leudado químicos, por ejemplo, bicarbonato sódico o mediante la adición de un leudante (masa de fermentación), pero se prefiere leudar la masa añadiendo un cultivo de levadura adecuado, tal como un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadero), por ejemplo, una cepa comercialmente disponible de *S. cerevisiae*.

45 La masa puede comprender grasas, tales como grasa o manteca granulada. La masa puede comprender además un emulsionante adicional tal como mono- o diglicéridos, ésteres de azúcar de ácidos grasos, poliglicerol ésteres de ácidos grasos, ésteres de ácido láctico de monoglicéridos, ésteres de ácido acético de monoglicéridos, estearatos de polioxietileno, o lisolecitina.

También se proporciona una premezcla que comprende harina junto con la combinación descrita en la presente. La premezcla puede contener aditivos mejoradores de la masa y/o aditivos mejoradores de pan, por ejemplo, cualquiera de los aditivos, que incluyen enzimas, mencionados en la presente.

50 Con el fin de mejorar aún más las propiedades del producto horneado e impartir calidades distintivas al producto horneados se pueden incorporar ingredientes de la masa y/o aditivos de masa adicionales en la masa. Típicamente, tales componentes añadidos adicionalmente pueden incluir ingredientes de la masa tales como sal, granos, grasas y aceites, azúcar o edulcorante, fibras dietéticas, fuentes de proteínas tales como leche en polvo, soja gluten o huevos y aditivos de masa tales como emulsionantes, otras enzimas, hidrocoloides, agentes saborizantes, agentes oxidantes, minerales y vitaminas.

- Los emulsionantes son útiles como reforzadores de la masa y suavizadores de la miga. Como reforzadores de la masa, los emulsionantes pueden proporcionar tolerancia con respecto al tiempo de reposo y tolerancia al choque durante la fermentación. Además, los reforzadores de la masa mejorarán la tolerancia de una masa dada a variaciones en el tiempo de fermentación. La mayoría de los reforzadores de la masa también mejoran el esponjado lo que significa el aumento del volumen de los productos fermentados a horneados. Por último, los reforzadores de la masa emulsionarán todas las grasas presentes en la mezcla de la receta.
- Los emulsionantes adecuados incluyen lecitina, estearato de polioxietileno, mono- y diglicéridos de ácidos grasos comestibles, ésteres de ácido acético de monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos comestibles, ésteres de ácido láctico de mono- y diglicéridos de ácidos grasos comestibles, ésteres de ácido cítrico de mono- y diglicéridos de ácidos grasos comestibles, ésteres de ácido diacetil tartárico de monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos comestibles, ésteres de sacarosa de ácidos grasos comestibles, estearoil-2-lactilato de sodio, y estearoil-2-lactilato de calcio.
- El aditivo o ingrediente de la masa adicional se pueden añadir junto con cualquier ingrediente de la masa que incluyen harina, agua u otros ingredientes o aditivos opcionales, o la composición mejoradora de la masa. El aditivo o ingrediente de masa adicional se pueden añadir antes de la harina, agua, otros ingredientes y aditivos opcionales o la composición mejoradora de la masa. El aditivo o ingrediente de masa adicional se pueden añadir después de la harina, agua, otros ingredientes y aditivos opcionales o la composición mejoradora de la masa.
- El aditivo o ingrediente de masa adicional puede ser convenientemente una preparación líquida. Sin embargo, el aditivo o ingrediente de masa adicional puede ser convenientemente en la forma de una composición seca.
- En un aspecto ele aditivo o ingrediente de masa adicional es al menos 1% del peso del componente de harina de la masa. En un aspecto adicional, el aditivo o ingrediente de masa adicional es al menos 2%, con preferencia al menos 3%, con preferencia al menos 4%, con preferencia al menos 5%, con preferencia al menos 6%. Si el aditivo es una grasa, luego normalmente la grasa puede estar presente en una cantidad de 1 a 5%, normalmente 1 a 3%, más normalmente aproximadamente 2%.
- Para el uso comercial y el uso doméstico de harina para hornear y producir alimentos, es importante mantener un nivel adecuado de actividad de •-amilasa en la harina. Un nivel de actividad que es demasiado alto puede producir un producto que es pegajoso y/o pastoso y por lo tanto no comercializable. La harina con insuficiente actividad de • -amilasa puede no contener suficiente azúcar para la función apropiada de levadura, lo que produce pan o productos horneados friables, secos. Por consiguiente, una variante, como se describe en la presente, por sí misma o en combinación con otra • -amilasa u otra variante, se puede añadir a la harina para aumentar el nivel de actividad de • -amilasa endógena en la harina. La variante de esta forma de realización puede tener una temperatura óptima en presencia de almidón, por ejemplo en los rangos de aproximadamente 30-90 °C, 40-80 °C, 40-50 °C, 45-65 °C, o 50-60 °C. El pH óptimo en una solución de 1% de almidón soluble puede ser por ejemplo entre pH 4,5 a 6,0.
- Los cereales, como la cebada, avena, trigo, así como componentes de la planta, tales como maíz, lúpulo, y arroz, también se utilizan para elaboración de la cerveza, tanto en la elaboración de cerveza industrial como casera. Los componentes utilizados en la industria cervecera pueden ser sin maltear o pueden ser malteada, es decir, parcialmente germinado, lo que produce un aumento en los niveles de enzimas, que incluyen • -amilasa. Para elaboración de la cerveza exitosa, son necesarios niveles adecuados de actividad de enzima • -amilasa para asegurar los niveles apropiados de azúcares para la fermentación. Una variante, por sí mismo o en combinación con otra • -amilasa, en consecuencia se puede añadir a los componentes usados para elaborar cerveza.
- Como se usa en la presente, el término "harina" significa grano de cereal molido o triturado. El término "harina" también puede significar productos de sagú o tubérculos que han sido molidos o triturados. En algunas formas de realización, la harina también puede contener componentes además de la materia de cereales o planta molido o triturado. Un ejemplo de un componente adicional, aunque no pretende ser limitante, es un agente leudante. Los granos de cereales incluyen trigo, avena, centeno y cebada. Los productos de tubérculos incluyen harina de tapioca, harina de yuca, y el polvo de flan. El término "harina" también incluye harina de maíz molida, sémola de maíz, harina de arroz, harina de trigo integral, harina leudante, harina de tapioca, harina de yuca, arroz molido, harina enriquecido, y el polvo de flan.
- Como se usa en la presente, el término "suministros", significa granos y componentes de la planta que se trituran o rompen. Por ejemplo, la cebada usada en la producción de cerveza es un grano que se ha molido o triturado grueso para obtener una consistencia apropiada para producir una pasta para la fermentación. Como usa en la presente, el término "suministros" incluye cualquiera de los tipos mencionados anteriormente de plantas y granos en formas trituradas o molidas en trozos grandes. Los métodos descritos en la presente se pueden usar para determinar los niveles de actividad de amilasa en ambas harinas y suministros.
- Una o más enzimas adicionales se pueden usar en combinación con las variantes de polipéptidos descritos en la presente. Tales combinaciones por ejemplo se pueden añadir a la comida, preparación de la masa, producto alimenticio o composición de almidón.

Las amilasas de horneado pueden provenir de un hongo, bacteria o planta. Puede ser una alfa-amilasa (EC 3.2.1.1). La lafa-amilasa puede ser una alfa-amilasa fúngica de *Aspergillus* o *Trichoderma*, por ejemplo de *Aspergillus oryzae*. O puede ser una alfa-amilasa de *Bacillus*, por ejemplo *B. amiloliquefaciens* o *B. licheniformis*. O puede ser una beta-amilasa de planta (EC 3.2.1.2), por ejemplo beta-amilasa de malta de cebada o poroto de soja o puede ser una exo-amilasa usada para el antienviejecimiento, por ejemplo exo-amilasa no maltogénica (EC 3.2.1.60) desarrollada de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* (SEQ ID NO: 10) o amilasa maltogénica (EC 3.2.1.133) desarrollada de *Bacillus stearothermophilus* que se describe adicionalmente a continuación.

En un aspecto, la amilasa adicional es una alfa-amilasa maltogénica. Una "alfa-amilasa maltogénica" (glucan 1,4-alfa-maltohidrolasa, E.C. 3.2.1.133) es capaz de hidrolizar amilosa y amilopectina a maltosa en la configuración alfa. Una alfa-amilasa maltogénica de *Bacillus* (EP 120 693) está disponible comercialmente bajo el nombre comercial Novamyl (Novozymes, Dinamarca) y se utiliza ampliamente en la industria de panadería como un agente antienviejecimiento debido a su capacidad para reducir la retrogradación del almidón. Novamyl se describe en detalle en la Publicación de Patente Internacional WO 91/04669. La alfa-amilasa maltogénica acciones Novamyl comparte varias características con ciclodextrina glucanotransferasas (CGTasas), que incluyen homología de secuencia (Henrissat B, Bairoch A; *Biochem. J.*, 316, 695-696 (1996)) y la formación de productos de transglicosilación (Christophersen, C., et al., 1997, *starch*, vol. 50, No. 1, 39-45). El Novamyl puede comprender en particular Novamyl 1500 MG. Otros documentos que describen Novamyl y sus usos incluyen Christophersen, C., Pedersen, S., y Christensen, T., (1993) Method for production of maltose an a limit dextrin, the limit dextrin, and use of the limit dextrin. Dinamarca, yo WO 95/10627. Se describe adicionalmente en la patente U.S. N.º 4.598.048 y la patente U.S. N.º 4.604.355. Los ejemplos preferidos de amilasas antienviejecimiento son exo-amilasas, por ejemplo, exo-amilasa no maltogénica o G4-amilasa (EC 3.2.1.60) desarrollada a partir de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* que tiene la SEQ ID NO: 1 o de amilasa maltogénica (EC 3.2.1.133) desarrollada a partir de *Bacillus stearothermophilus* que tiene la SEQ ID NO: 51.

Una amilasa antienviejecimiento reduce el envejecimiento después del horneado y lleva a una reducción en el aumento de la firmeza y una reducción de la disminución de la elasticidad desde el 1 al día 7 después del horneado con relación a un control sin enzima. Una amilasa antienviejecimiento se puede analizar mediante la realización de una prueba de horneado y usando análisis de textura para determinar el desarrollo de la firmeza y elasticidad con el tiempo. El análisis de textura se describe en el ejemplo 11.

Las enzimas adicionales se pueden seleccionar de, por ejemplo, cualquier combinación de los siguientes: (a) Novamyl, o una variante, homólogo, o mutantes de esta que tienen actividad de alfa-amilasa maltogénica; (c) una xilanasas como GRINDAMYL™ POWERBake 900 (Danisco A/S); (c) una  $\alpha$ -amilasa bacteriana tal como Max-Life U4 (Danisco A/S); y (d) una lipasa tal como GRINDAMIL™ POWERBake 4050 (Danisco A/S).

En una forma de realización una variante de polipéptido descrita en la presente se usa en combinación con al menos una enzima seleccionada de la lista que consiste en oxidorreductasas, hidrolasas, lipasas, esterases, glicosidasas, amilasas, pululanadas, xilanasas, celulasas, hemicelulasas, enzimas degradantes de almidón, proteasas y lipoxigenasas. En una forma de realización, la composición comprende al menos una variante de polipéptido descrita en la presente y una amilasa maltogénica de *Bacillus*, descrita en WO91/04669. Una forma de realización comprende una variante de polipéptido descrita en la presente y harina.

Otras enzimas que se pueden añadir a la masa incluyen oxidorreductasas, hidrolasas, tales como lipasas y esterases, así como glicosidasas como  $\alpha$ -amilasa, pululanasa y xilanasas. Las oxidorreductasas, tales como por ejemplo glucosa oxidasa y hexosa oxidasa, se pueden utilizar para el fortalecimiento de la masa y el control de volumen de los productos horneados y xilanasas y otras hemicelulasas masa se puede añadir para mejorar las propiedades de manipulación de la masa, firmeza de la miga y el volumen del pan. Las lipasas son útiles como reforzadores de la masa y suavizadores de la miga y  $\alpha$ -amilasas y otras enzimas amilolíticas se pueden incorporar en la masa para controlar el volumen del pan y reducir aún más firmeza de la miga.

Otras enzimas que se pueden usar se pueden seleccionar del grupo que consiste en una celulasa, una hemicelulasa, una enzima de degradación del almidón, una proteasa, una lipoxigenasa.

Una variante, como se define en la presente, también se puede añadir sola o en combinación con otras amilasas, que incluyen otras variantes de amilasa para prevenir o retardar el envejecimiento, es decir, firmeza de la miga de los productos horneados. La cantidad de amilasa antienviejecimiento normalmente estará en el rango de 0,01-10 mg de proteína enzimática por kg de harina, por ejemplo, 0,5 mg/kg ds. Las amilasas antienviejecimiento adicionales se pueden usar en combinación con una variante de polipéptido descrita en la presente incluyen una endo-amilasa, por ejemplo, una endo-amilasa bacteriana de *Bacillus*. La amilasa adicional puede ser una  $\bullet$ -amilasa maltogénica (EC 3.2.1.133), por ejemplo, de *Bacillus*. Novamil® es un ejemplo de  $\bullet$ -amilasa maltogénica de *B. stearothermophilus* cepa NCIB 11837 y se describe en Christophersen et al., *Starch* 50: 39-45 (1997). Otros ejemplos de endo-amilasas antienviejecimiento incluyen  $\bullet$ -amilasas bacterianas derivadas de *Bacillus*, tal como *B. licheniformis* o *B. amiloliquefaciens*. La amilasa antienviejecimiento puede ser una exo-amilasa, tal como  $\bullet$ -amilasa, por ejemplo, de fuentes vegetales, tal como soja o de fuentes microbianas, tal como *Bacillus*.

- La composición de horneado que comprende una variante de polipéptido descrita en la presente puede comprender además una fosfolipasa. La fosfolipasa puede tener actividad A<sub>1</sub> o A<sub>2</sub> para eliminar el ácido graso de los fosfolípidos, lo que forma un lisofosfolípido. Puede tener o no actividad de lipasa, es decir, la actividad en sustratos de triglicéridos. La fosfolipasa típicamente tiene una temperatura óptima en el rango de 30-90°C, por ejemplo, 30-70°C. Las fosfolipasas añadidas pueden ser de origen animal, por ejemplo, de páncreas, por ejemplo, páncreas bovino o porcino, veneno de serpiente o veneno de abeja. Alternativamente, la fosfolipasa puede ser de origen microbiano, por ejemplo, de hongos filamentosos, levaduras o bacterias, tales como el género o especie. Los ejemplos de fuentes de fosfolipasas incluyen *Aspergillus*, *A. niger*; *Dictyostelium*, *D. discoideum*; *Mucor*, *M. javanicus*, *M. mucedo*, *M. subtilissimus*; *Neurospora*, *N. crassa*; *Rhizomucor*, *R. pusillus*; *Rhizopus*, *R. arrhizus*, *R. japonicus*, *R. stolonifer*; *Sclerotinia*, *S. libertiana*; *Trichophyton*, *T. rubrum*; *Whetzelinia*, *W. sclerotiorum*; *Bacillus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*; *Citrobacter*, *C. freundii*; *Enterobacter*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*; *Edwardsiella*, *E. tarda*; *Etwinia*, *E. herbicola*; *Escherichia*, *E. coli*; *Klebsiella*, *K. pneumoniae*; *Proteus*, *P. vulgaris*; *Providencia*, *P. stuartii*; *Salmonella*, *S. typhimurium*; *Serratia*, *S. liquefaciens*, *S. marcescens*; *Shigella*, *S. flexneri*; *Streptomyces*, *S. violeceoruber*; *Yersinia*, *Y. enterocolitica*; *Fusarium*, y *F. oxysporum* (por ejemplo, cepa DSM 2672).
- La fosfolipasa se añade en una cantidad que mejora la suavidad del pan durante el período inicial después del horneado, en particular de las primeras 24 horas. La cantidad de fosfolipasa estará típicamente en el rango de aproximadamente 0,01 a 10 mg de proteína enzimática por kg de harina, por ejemplo, 0,1 a 5 mg/kg. La actividad de la fosfolipasa generalmente estará en el rango de aproximadamente 20 a 1000 Unidad de Lipasa (LU)/kg de harina, donde una unidad de lipasa se define como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μmol de ácido butírico por minuto a 30°C, pH 7,0, con goma arábiga como emulsionante y tributirina como sustrato.
- Las composiciones de masa generalmente comprenden sémola de trigo o harina de trigo y/o otros tipos de sémola, harina o almidón tal como harina de maíz, almidón de maíz, harina de maíz, harina de arroz, harina de centeno, sémola de centeno, harina de avena, sémola de avena, harina de soja, sémola de sorgo, harina de sorgo, sémola de papa, harina de patata o almidón de papa. La masa puede ser fresca, congelada, o parcialmente horneada. La masa puede ser una masa leudada o una masa que se debe someter al leudado. La masa se puede leudar de varias maneras, tales como mediante la adición de agentes de leudado químicos, por ejemplo, bicarbonato sódico o mediante la adición de un leudante, es decir, masa de fermentación. La masa también se puede leudar mediante la adición de un cultivo de levadura adecuado, tal como un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadero), por ejemplo, una cepa comercialmente disponible de *S. cerevisiae*.
- La masa también puede comprender otros ingredientes convencionales de la masa, por ejemplo, proteínas, tal como leche en polvo, gluten y soja; huevos (por ejemplo, huevos enteros, yemas de huevo o claras de huevo); un oxidante, tal como ácido ascórbico, bromato de potasio, yodato de potasio, azodicarbonamida (ADA) o persulfato de amonio; un aminoácido tal como L-cisteína; un azúcar; o una sal, tal como cloruro de sodio, acetato de calcio, sulfato de sodio o sulfato de calcio. La masa grasa puede comprender además, por ejemplo, triglicéridos, tales como grasa o manteca granulada. La masa puede comprender además un emulsionante tal como mono- o diglicéridos, ésteres de ácido diacetil tartárico de mono o diglicéridos, ésteres de azúcar de ácidos grasos, poliglicerol ésteres de ácidos grasos, ésteres de ácido láctico de monoglicéridos, ésteres de ácido acético de monoglicéridos, estearatos de polioxi-etileno o lisolecitina. En particular, la masa se puede hacer sin adición de emulsionantes.
- Opcionalmente, se puede usar una enzima adicional junto con la amilasa de anti-vejecimiento y la fosfolipasa. La enzima adicional puede ser una segunda amilasa, tal como una amiloglucosidasa, una α-amilasa, una ciclodextrina glucanotransferasa, o de la enzima adicional puede ser una peptidasa, en particular una exopeptidasa, una transglutaminasa, una lipasa, una celulasa, una hemicelulasa, en particular una pentosanasa, tal como xilanasa, una proteasa, una proteína disulfuro isomerasa, por ejemplo, una proteína disulfuro isomerasa, como se describe en WO 95/00636, por ejemplo, una glicosiltransferasa, una enzima de ramificación (enzima de ramificación 1,4-α-glucano), una 4-α-glucanotransferasa (dextrina glicosiltransferasa) o una oxidorreductasa, por ejemplo, una peroxidasa, una lacasa, una glucosa oxidasa, una piranosa oxidasa, una lipoxigenasa, una L-aminoácido oxidasa o una carbohidrato oxidasa. La enzima adicional puede ser de cualquier origen, incluyendo mamíferos y plantas, y en particular de origen microbiano (bacteriano, levadura o fúngico) y se puede obtener mediante técnicas usadas convencionalmente en la materia.
- La xilanasa es normalmente de origen microbiano, por ejemplo, derivado de una bacteria u hongo, tal como una cepa de *Aspergillus*, en particular de *A. aculeatus*, *A. niger* (cf. WO 91/19782), *A. awamori* (por ejemplo, WO 91/18977), o *A. tubigensis* (por ejemplo, WO 92/01793); de una cepa de *Trichoderma*, por ejemplo, *T. reesei*, o de una cepa de *Humicola*, por ejemplo, *H. insolens* (por ejemplo, WO 92/17573). *Pentopan*® y *Novozym 384*® son preparaciones de xilanasa disponibles en el comercio producidas de *Trichoderma reesei*. La amiloglucosidasa puede ser una amiloglucosidasa de *A. niger* (tal como AMG®). Otros productos de amilasa útiles incluyen *Grindamil*® A 1000 o A 5000 (disponible en Danisco, Dinamarca) y *Amylase*® H o *Amylase*® P (disponible en Gist-Brocades, Holanda). La glucosa oxidasa puede ser una glucosa oxidasa fúngica, en particular una glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* (tal como Gluzyme®). Un ejemplo de proteasa es *Neutrase*®. Un ejemplo de lipasa se puede derivar de las cepas de *Thermomyces* (*Humicola*), *Rhizomucor*, *Candida*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, o *Pseudomonas*, en particular de *Thermomyces lanuginosus* (*Humicola lanuginosa*), *Rhizomucor miehei*, *Candida antarctica*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar* o *Rhizopus arrhizus*, o *Pseudomonas cepacia*. En forma de realizaciones específicas, la lipasa puede ser Lipasa A o Lipasa B derivada de *Candida Antarctica* como se describe en el documento WO

88/02775, por ejemplo, o la lipasa se puede derivar de *Rhizomucor miehei* como se describe en el documento EP 238,023, por ejemplo, o *Humicola lanuginosa*, descrita en el documento EP 305.216, por ejemplo, o *Pseudomonas cepacia* como se describe en los documentos EP 214,761 y WO 89/01032, por ejemplo.

5 El proceso se puede usar para cualquier tipo de producto horneado preparado a partir de masa, ya sea de un carácter suave o crujiente, ya sea de tipo blanco, claro u oscuro. Los ejemplos son pan, en particular pan blanco, integral o centeno, por lo general en forma de panes o rollos, tales como, pero sin limitación, pan tipo baguette francesa, pan de pita, tortillas, tortas, panqueques, bizcochos, galletitas, masa quebrada, pan crujiente, pan al vapor, pizza y similares.

10 En otra forma de realización, una variante de polipéptido descrita en la presente se puede usar en una premezcla, que comprende harina junto con una amilasa antienviejimiento, una fosfolipasa y un fosfolípido. La premezcla puede contener otros aditivos mejoradores de masa y/o mejoradores del pan, por ejemplo, cualquiera de los aditivos, que incluyen las enzimas, mencionadas anteriormente. En un aspecto, la variante de polipéptido descrita en la presente es un componente de una preparación enzimática que comprende una amilasa antienviejimiento y una fosfolipasa, para usar como aditivo de horneado.

15 La preparación enzimática está opcionalmente en forma de un granulado o polvo aglomerado. La preparación puede tener una distribución de tamaño de partícula estrecha de más de 95% (en peso) de las partículas en el rango de 25 a 500 µm. Los granulados y polvos aglomerados se pueden preparar por métodos convencionales, por ejemplo, por pulverización de la de polipéptido descrita en la presente sobre un portador en un granulador de lecho fluido. El portador puede consistir en núcleos de partículas que tienen un tamaño de partícula adecuado. El portador puede ser soluble o insoluble, por ejemplo, una sal (tal como NaCl o sulfato de sodio), un azúcar (tal como sacarosa o lactosa), un alcohol de azúcar (tal como sorbitol), almidón, arroz, sémola de maíz, o soja.

20 Otro aspecto contempla la envoltura de partículas que comprenden una variante de polipéptido descrita en la presente, es decir, partículas de • -amilasa. Para preparar las partículas de amilasa envueltas, la enzima se pone en contacto con un lípido de calidad alimentaria en cantidad suficiente para suspender la totalidad de las partículas de • -amilasa. Los lípidos de calidad alimentaria, como se usa en la presente, pueden ser cualquier compuesto orgánico natural, que insoluble en agua pero es soluble en solventes orgánicos no polares tales como hidrocarburos o éter dietílico. Los lípidos adecuados de calidad alimentaria incluyen, pero sin limitación, triglicéridos, ya sea en forma de grasas o aceites que son saturados o insaturados. Los ejemplos de ácidos grasos y combinaciones de estos que componen los triglicéridos saturados incluyen, pero sin limitación, ácido butírico (derivado de grasa de la leche), palmítico (derivado de grasa animal y vegetal), y/o esteárico (derivado de grasa animal y vegetal). Los ejemplos de ácidos grasos y combinaciones de estos que componen los triglicéridos insaturados incluyen, pero sin limitación, palmitoleico (derivado de grasa animal y vegetal), oleico (derivado de grasa animal y vegetal), linoleico (derivado de los aceites vegetales), y/o linolénico (derivado de aceite de linaza). Otros lípidos adecuados de calidad alimentaria incluyen, pero sin limitación, monoglicéridos y diglicéridos derivados de los triglicéridos mencionados anteriormente, fosfolípidos y glicolípidos.

25 El lípido de calidad alimentaria, en particular en forma de líquido, se pone en contacto con una forma en polvo de las partículas de • -amilasa de manera tal que el material de lípidos cubre al menos una porción de la superficie de al menos una mayoría, por ejemplo, 100% de las partículas de • -amilasa. De este modo, cada partícula de • -amilasa está envuelto individualmente en un lípido. Por ejemplo, todas o sustancialmente todas las partículas de • -amilasa están provistas de una película envolvente de lípidos fina y continua. Esto se puede lograr mediante el vertido primero de una cantidad de lípidos en un recipiente y, a continuación suspensión de las partículas de fina, continua de manera que el lípido humecta completamente la superficie de cada partícula de • -amilasa. Después de un corto periodo de agitación, las partículas de • -amilasa envueltas, que llevan una cantidad sustancial de los lípidos en sus superficies, se recuperan. El grosor del recubrimiento aplicado de este modo a las partículas de • -amilasa se puede controlar mediante la selección del tipo de lípido utilizado y la repetición de la operación con el fin de construir una película más gruesa, cuando se desee.

30 El almacenamiento, la manipulación y la incorporación del vehículo de administración cargado se puede lograr por medio de una mezcla envasada. La mezcla envasada puede comprender la • -amilasa con envoltura. Sin embargo, la mezcla de envasado puede contener además ingredientes adicionales según sea requerido por el fabricante o el panadero. Después de que la • -amilasa con envoltura se ha incorporado en la masa, el panadero continúa a través del proceso normal de producción de dicho producto.

35 Las ventajas de envolver las partículas de • -amilasa son de dos veces. En primer lugar, el lípido de calidad alimentaria protege la enzima de la desnaturalización térmica durante el proceso de horneado para las enzimas que son lábiles al calor. En consecuencia, mientras que la • -amilasa se estabiliza y protege durante las etapas de fermentación y horneado, se libera de la capa protectora en el producto horneado final, en el que hidroliza los enlaces glucosídicos en poliglucanos. El vehículo de suministro cargado también proporciona una liberación sostenida de la enzima activa en el producto horneado. Es decir, después de proceso de horneado, la • -amilasa activa se libera continuamente de la capa protectora a una tasa que contrarresta, y por lo tanto reduce la tasa de los mecanismos de envejecimiento.



En n general, la cantidad de lípidos aplicado a las partículas • -amilasa puede variar de unos pocos por ciento del peso total de la • -amilasa en muchas veces es el peso, de acuerdo con la naturaleza del lípido, la manera en la que se aplica a las partículas de • -amilasa, la composición de la mezcla de la masa para tratar, y la gravedad de la operación de mezcla de la masa involucrada.

5 El vehículo de suministro cargado, es decir, la enzima con envoltura de lípidos, se añade a los ingredientes usados para preparar un producto horneado en una cantidad efectiva para extender la vida útil del producto horneado. El panadero calcula la cantidad de • -amilasa con envoltura, preparada como se describió anteriormente, que se requerirá para lograr el efecto antienviejecimiento deseado. La cantidad de • -amilasa con envoltura, necesaria se calcula sobre la base de la concentración de la enzima con envoltura en la proporción de • -amilasa a la harina especificada. Se ha hallado que un amplio rango de concentraciones es efectivo, aunque, como se ha discutido, las mejoras observables en el antienviejecimiento no corresponden linealmente con la concentración de • -amilasa, pero por encima de ciertos niveles mínimos, grandes aumentos en la concentración de • -amilasa producen poca mejora adicional. La concentración de • -amilasa utilizada realmente en una producción de panadería particular podría ser mucho más alta que la mínima necesaria para proporcionar al panadero algo de seguridad contra errores involuntarios de medición por el panadero. El límite inferior de concentración de la enzima se determina por el mínimo efecto antienviejecimiento que el panadero desea alcanzar.

Un método para preparar un producto horneado puede comprender: (a) preparar partículas de • -amilasa recubiertas con lípido, donde sustancialmente todas las partículas de • -amilasa están recubiertas; (b) mezclar una masa que contiene harina; (c) añadir las partículas de • -amilasa recubiertas con lípido antes de que la mezcla esté completa y 20 terminar la mezcla antes de eliminar la capa de lípidos de la • -amilasa; (d) fermentar la masa; y (e) hornear la masa para proporcionar el producto horneado, en el que la • -amilasa está inactivo durante las etapa de mezcla, fermentación y horneado y está activa en el producto horneado.

La • -amilasa con envoltura se puede añadir a la masa durante el ciclo de mezcla, por ejemplo, cerca del final del ciclo de mezcla. La • -amilasa con envoltura se añade en un punto en la etapa de mezcla que permite la distribución suficiente de la • -amilasa con envoltura en toda la masa; sin embargo, la etapa de mezclado se termina antes de que la capa protectora sea desprendida de la partícula de • -amilasa. De acuerdo con el tipo y volumen de la masa, y la acción y velocidad del mezclador, se puede requerir en cualquier momento de uno a seis minutos o más para mezclar la • -amilasa con envoltura en la masa, pero dos a cuatro minutos es el promedio. Por lo tanto, varias variables pueden determinar con precisión el procedimiento. En primer lugar, la cantidad de • -amilasa con envoltura debe tener un volumen total suficiente para permitir que la • -amilasa con envoltura se extienda por toda la mezcla de masa. Si la preparación de • -amilasa con envoltura está muy concentrada, puede ser necesario añadir aceite a la premezcla antes de añadir la • -amilasa con envoltura a la masa. Las recetas y procesos de producción pueden requerir modificaciones específicas; sin embargo, los buenos resultados en general, se pueden lograr cuando el 25% del aceite especificado en una fórmula de masa de pan se mantiene fuera de la masa y se utiliza como un portador para una • -amilasa con envoltura concentrada cuando se añade cerca del final del ciclo de mezcla. En pan u otros productos horneados, especialmente los que tienen un bajo contenido de grasa, por ejemplo, los panes de tipo francés, una mezcla de • -amilasa con envoltura de aproximadamente 1% del peso de harina seca es suficiente para mezclar la • -amilasa con envoltura correctamente con la masa. El rango de porcentajes adecuados es amplio y depende de la fórmula, producto terminado y los requerimientos de la metodología de producción del panadero individual. En segundo lugar, la suspensión de la • -amilasa con envoltura se debe añadir a la mezcla con el tiempo suficiente para la mezcla completa en la masa, pero no durante un tiempo tal que la acción mecánica excesiva desprenda la capa lipídica protectora de las partículas de • -amilasa con envoltura.

#### 6. Composiciones de desencolado textil y uso

También se contemplan las composiciones y métodos de tratar telas (por ejemplo, para desencolar un tejido) usando una variante de polipéptido descrita en la presente. En un aspecto, se proporciona un método de desencolar tejidos, que comprende poner en contacto la variante de polipéptido descrita en la presente con un tejido durante un tiempo suficiente para desencolar el tejido.

Los métodos de tratamiento de telas son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, la Patente U.S. N.º 6.077.316). Por ejemplo, en un aspecto, el tacto y el aspecto de una tela se mejora mediante un método que comprende poner en contacto la tela con la variante de polipéptido descrita en la presente en una solución. En un aspecto, la tela se trata con la solución bajo presión.

En un aspecto, una variante de polipéptido descrita en la presente se aplica durante o después del tejido de un tejido, o durante la etapa de desencolado, o una o más etapas adicionales de procesamiento de tejido. Durante el tejido del material textil, los hilos se exponen a tensión mecánica considerable. Antes de tejer en telares mecánicos, los hilos de urdimbre a menudo se recubren con almidón de encolado o derivados de almidón para aumentar su resistencia a la tracción y para evitar la rotura. Una variante de polipéptido descrita en la presente se puede aplicar durante o después del tejido para eliminar estos derivados de almidón de encolada o almidón. Después de tejer, una variante de polipéptido descrita en la presente se puede usar para eliminar la ACPA de encolado antes de procesar adicionalmente la tela para asegurar un resultado homogéneo y a prueba de agua.

A variante de polipéptido descrita en la presente se puede usar solo o con otros reactivos químicos de descolado y/o enzimas de descolado para descolar telas, incluidos las telas que contienen algodón, como aditivos detergentes, por ejemplo, en composiciones acuosas. Una variante de polipéptido descrita en la presente también se puede utilizar en composiciones y métodos para producir un aspecto de lavado a la piedra en la tela y prendas de denim teñidas con índigo. Para la fabricación de ropa, la tela se puede cortar y coser ropa o prendas de vestir, que luego se someten al acabado. En particular, para la fabricación de pantalones vaqueros, se han desarrollado diferentes métodos de acabado enzimático. El acabado de prendas de denim normalmente se inicia con una etapa de descolado enzimático, durante la cual las prendas se someten a la acción de enzimas amilolíticas para proporcionar suavidad a la tela y hacer al algodón más accesible a las etapas de acabado enzimático posteriores.

Una variante del polipéptido descrita en la presente se puede usar en métodos de acabado de prendas de denim (por ejemplo, un "proceso de pre-lavado biológico"), descolado enzimático y provisión de suavidad a los tejidos, y/o proceso de acabado.

La descripción proporciona los siguientes ítems:

1. Un polipéptido que tiene actividad amilasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene
  - a. al menos 65 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y en donde el polipéptido comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: 88 o 205, y/o
  - b. al menos 78 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y en donde el polipéptido comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: 16, 48, 97, 105, 235, 240, 248, 266, 311, 347, 350, 362, 364, 369, 393, 395, 396, 400, 401, 403, 412 ó 409, y/o
  - c. al menos 78 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y en donde el polipéptido comprende una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K/AV/N/I/H/F, 34Q, 100Q/K/N/R, 272D, 392 K/D/E/Y/N/Q/R/T/G o 399C/H, y/o
  - d. al menos 95% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y en donde el polipéptido comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: 44, 96, 204, 354 o 377, y/o
  - e. al menos 95% identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y en donde el polipéptido comprende la siguiente sustitución de aminoácido: 392S

en donde una sustitución de aminoácido está relacionada con el aminoácido correspondiente de la SEQ ID NO:1 y las posiciones son con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.
2. Un polipéptido que tiene actividad amilasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 65 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y en donde el polipéptido comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: 88, o 205 y/o una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K, 235H/K/R, 240E, 392 K/D/E/Y o 409E en donde una sustitución de aminoácido está relacionada con el aminoácido correspondiente de la SEQ ID NO:1 y las posiciones son con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.
3. El polipéptido de acuerdo con el ítem 1, en donde el polipéptido comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: 88, 205, 235, 240, 248, 266, 311, 377 o 409 y/o una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K/AV/N/I/H/F, 34Q, 100Q/K/N/R, 272D o 392K/D/E/Y/N/Q/R/S/T/G.
4. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1 y 3, en donde el polipéptido comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: 88, 205, 235, 240, 311 o 409 y/o una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K/N/I/H/F, 272D, o 392 K/D/E/Y/N/Q/R/S/T/G.
5. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1 y 3-4, en donde el polipéptido comprende sustituciones de aminoácidos al menos en cuatro, cinco o en todas las siguientes posiciones: 88, 205, 235, 240, 311 o 409 y/o tiene al menos una, o dos de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K/N/I/H/F, 272D o 392 K/D/E/Y/N/Q/R/S/T/G.
6. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-5, en donde el polipéptido comprende además uno o más de los siguientes aminoácidos 33Y, 34N, 70D, 121F, 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E/S/K/A, 229P, 307K, 309P o 334P.
7. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-6, en donde el polipéptido tiene además los siguientes aminoácidos 33Y, 34N, 70D, 121F, 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 229P, 307K, 309P y 334P.
8. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-6, en donde el polipéptido tiene al menos una de las sustituciones de aminoácidos en b) del ítem 1 y además comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: 44, 96, 204, 354 o 377.

## ES 2 604 666 T3

9. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-8 que tiene al menos 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.
10. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-9, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 34Q.
- 5 11. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1 y 2-10, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 42K/F/H/I/N/A/V.
12. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1 y 2-10, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 42K/F/H/I/N.
13. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-12, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 42K.
- 10 14. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-13, en donde el polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 88.
15. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-14, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 88L/Y/K.
16. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-15, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 88L.
17. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-16, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 88Y.
- 15 18. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-17, en donde el polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 205.
19. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-18, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 205L/K/M/N/Q/R/V/Y.
- 20 20. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-19, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 205L/K/M/N/Q/R/V.
21. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-20, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 205L.
22. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1 y 2-21, en donde el polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 235.
- 25 23. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1 y 2-22, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 235H/K/R/Q/S.
24. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1 y 2-23, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 235H/K/R/Q.
25. El polipéptido de acuerdo con los ítems 2 o 24, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 235H/K/R.
26. El polipéptido de acuerdo con los ítems 2 o 25, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 235R.
- 30 27. El polipéptido de acuerdo con los ítems 2 o 25, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 235H.
28. El polipéptido de acuerdo con los ítems 2 o 25, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 235K.
29. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1 y 2-28, en donde el polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 240.
30. El polipéptido de acuerdo con los ítems 29, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 240E/H/M/D/S.
- 35 31. El polipéptido de acuerdo con los ítems 29, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 240E/H/M/D.
32. El polipéptido de acuerdo con los ítems 2 ó 29, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 240E.
33. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-32, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 272D.
34. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-33, en donde el polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 311.
- 40 35. El polipéptido de acuerdo con los ítems 2 ó 34, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 311P.
36. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1 y 2-35, en donde el polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 409.
37. El polipéptido de acuerdo con los ítems 36, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 409H/Q/T/E.

## ES 2 604 666 T3

38. El polipéptido de acuerdo con los ítems 2 ó 37, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 409E.
39. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-38, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 100Q/K/N/R.
40. El polipéptido de acuerdo con los ítems 39, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 100Q.
- 5 41. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1 y 2-39, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 392D/E/K/Y/N/Q/R/S/T/G.
42. El polipéptido de acuerdo con los ítems 41, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 392D/E/K/Y/N/Q/R/S/T.
43. El polipéptido de acuerdo con los ítems 2 ó 41, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 392D/E/K/Y.
44. El polipéptido de acuerdo con los ítems 43, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 392D.
- 10 45. El polipéptido de acuerdo con los ítems 43, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 392E.
46. El polipéptido de acuerdo con los ítems 43, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 392K.
47. El polipéptido de acuerdo con los ítems 43, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 392Y.
48. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-47, en donde el polipéptido tiene los dos aminoácidos siguientes 235R y 311P.
- 15 49. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-48, en donde el polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 16.
50. El polipéptido de acuerdo con los ítems 49, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 16/A/E/K.
51. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-50, en donde el polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 48.
- 20 52. El polipéptido de acuerdo con los ítems 51, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 48/C/L.
53. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-52, en donde el polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 97.
54. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-53, en donde el polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 105.
- 25 55. El polipéptido de acuerdo con los ítems 54, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 105/N/R.
56. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-55, en donde el polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 248.
57. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-56, en donde el polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 266.
- 30 58. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-57, en donde el polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 347.
59. El polipéptido de acuerdo con los ítems 58, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 347/C/D/H/K.
60. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-59, en donde el polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 350.
- 35 61. El polipéptido de acuerdo con los ítems 60, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 350E/H/N.
62. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-61, en donde el polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 354.
63. El polipéptido de acuerdo con los ítems 62, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 354D/E.
- 40 64. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-63, en donde el polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 362.
65. El polipéptido de acuerdo con los ítems 64, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 362E/H/P.
66. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-65, en donde el polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 364.

67. El polipéptido de acuerdo con los ítems 66, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 364E/K/NQ.
68. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-67, en donde el polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 369.
69. El polipéptido de acuerdo con los ítems 68, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 369I/N.
- 5 70. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-69, en donde el polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 377.
71. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-70, en donde el polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 393.
72. El polipéptido de acuerdo con los ítems 71, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 393D/E/K.
- 10 73. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-72, en donde el polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 395.
74. El polipéptido de acuerdo con los ítems 73, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 395C/E/K.
75. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-74, en donde el polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 396.
- 15 76. El polipéptido de acuerdo con los ítems 75, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 396D/E.
77. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-76, en donde el polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 399.
78. El polipéptido de acuerdo con los ítems 77, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 399C/H.
- 20 79. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-78, en donde el polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 400.
80. El polipéptido de acuerdo con los ítems 79, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 400S/W.
81. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-80, en donde el polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 401.
82. El polipéptido de acuerdo con los ítems 81, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 401D/K.
- 25 83. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-82, en donde el polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 403.
84. El polipéptido de acuerdo con los ítems 83, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 403E/T/V.
85. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-84, en donde el polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 412.
- 30 86. El polipéptido de acuerdo con los ítems 85, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 412D/N.
87. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-86, en donde el polipéptido comprende además uno o más de los siguientes aminoácidos 121F, 134R, 141P, 229P o 307K.
88. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-87, en donde el polipéptido tiene uno o más de los siguientes aminoácidos 42K, 88L, 205L, 235R, 240E, 272D, 311P, 392D y 409E.
- 35 89. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-88, en donde el polipéptido comprende los siguientes aminoácidos 42K, 88L, 235R, 311P, 392D y o bien 223S, 223K o 223A.
90. El polipéptido de acuerdo con los ítems 89 que comprende además uno o más seleccionados del grupo que consiste en 272D, 409E, 205L o 240E.
- 40 91. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-90, en donde el polipéptido tiene al menos cuatro, cinco, seis, siete u ocho de los siguientes aminoácidos 42K, 88L, 205L, 235R, 240E, 272D, 311P, 392D o 409E.
92. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-91, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 223A/K/S.
93. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-92, en donde el polipéptido tiene los siguientes aminoácidos 42K, 88L, 223S, 235R, 311P y 392D.

## ES 2 604 666 T3

94. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-93, en donde el polipéptido tiene los siguientes aminoácidos 42K, 88L, 223K, 235R, 272D, 311P y 392D.
95. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-94, en donde el polipéptido tiene los siguientes aminoácidos 42K, 88L, 223S, 235R, 311P, 392D y 409E.
- 5 96. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-95, en donde el polipéptido tiene los siguientes aminoácidos 42K, 88L, 205L, 223S, 235R, 311P, 392D y 409E.
97. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-96, en donde el polipéptido tiene los siguientes aminoácidos 42K, 88L, 205L, 223K, 240E, 235R, 311P, 392D y 409E.
- 10 98. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-97, en donde el polipéptido tiene los siguientes aminoácidos 42K, 88L, 205L, 223A, 2235R, 311P, 392D y 409E.
99. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-98 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34.
- 15 100. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-99 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17,
101. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-100 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34, y opcionalmente uno o más aminoácidos adicionales en el extremo N.
- 20 102. El polipéptido de acuerdo con los ítems 101 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, y SEQ ID NO: 17, y opcionalmente uno o más aminoácidos adicionales en el extremo N.
- 25 103. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 101-102 en donde dichos uno o más aminoácidos adicionales en el extremo N es un M.
- 30 104. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-103, en donde el polipéptido comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: 88, 205, 235 o 409 y/o una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K, 34Q, 100Q, 223A/S, 240E, 311P, 392D, o 409E con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.
- 35 105. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-104, en donde el polipéptido comprende una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K, 34Q, 88K/L/Y, 100Q, 205L, 223A/S/K, 235K/H/Q/R, 240E/D, 248H, 266T, 311P, 377D/E/P, 392K/D/Y o 409E.
106. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-105, en donde el polipéptido comprende una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 34Q, 42K, 88L, 100Q, 205L, 223A/S/K, 235K/R, 240E, 311P, 392D o 409E.
- 40 107. El polipéptido de acuerdo con los ítems 106, en donde el polipéptido comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: 235R y 311P.
108. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-107, en donde el polipéptido comprende la sustitución de aminoácido 42K.
- 45 109. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-108, en donde el polipéptido comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K y 223S.
110. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-109, en donde el polipéptido comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K, 223S y 392D.
111. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-110, en donde el polipéptido comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K, 88L, 223A, 235R, 311P y 392D.
- 50 112. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-111, en donde el polipéptido comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K, 88L, 205L, 223S, 235R, 240E, 311P, 392D y 409E.

113. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-112, en donde el polipéptido comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K, 88L, 205L, 223K, 235R, 240E, 311P, 392D y 409E.
114. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-113, en donde el polipéptido comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K, 88L, 205L, 223S, 235R, 311P y 392D.
- 5 115. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-114, en donde el polipéptido comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: 34Q, 42K, 88L, 205L, 223K, 235R, 240E, 311P, 392D y 409E.
116. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-115, en donde el polipéptido comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K, 88L, 100Q, 205L, 223K, 235R, 240E, 311P, 392D y 409E.
- 10 117. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-116 que comprende además un dominio de ligación a almidón en el extremo C.
118. El polipéptido de acuerdo con los ítems 117 en donde el dominio de ligación a almidón es el residuo de SEQ ID NO: 36.
119. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-118 que tiene un ligador fusionado al extremo C.
120. El polipéptido de acuerdo con los ítems 119, en donde el ligador es el residuo de SEQ ID NO: 35.
- 15 121. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-120 que tiene exoactividad amilasa.
122. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-121 que tiene exoactividad amilasa no maltogénica.
123. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-122, en donde el polipéptido presenta una mayor termoestabilidad cuando se compara con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 10.
- 20 124. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-123, en el cual la vida media ( $t_{1/2}$ ), preferentemente a 60 grados C, está aumentada en un 15% o más, preferentemente 50% o más, más preferentemente 100% o más, con relación a la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 10.
- 25 125. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-124, en el cual un producto alimenticio tratado con el polipéptido tiene una cualquiera o más, preferentemente todas las siguientes propiedades: (a) menor firmeza; (b) mayor resistencia; (c) mayor cohesividad; (d) menor friabilidad; y (e) mayor capacidad de plegado en comparación con un producto alimenticio que ha sido tratado con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 10.
- 30 126. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-125, en el cual la resistencia, la cohesividad o la capacidad de plegado del producto alimenticio tratado con el polipéptido está aumentada independientemente en un 15% o más, preferentemente 50% o más, más preferentemente 100% o más, con relación a un producto alimenticio que ha sido tratado con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 10.
- 35 127. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-126, en el cual cada una de la resistencia, la cohesividad y la capacidad de plegado de un producto alimenticio tratado con el polipéptido está aumentada en comparación con un producto alimenticio que ha sido tratado con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 10.
128. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-127, en el cual la firmeza o la friabilidad del producto alimenticio tratado con el polipéptido está disminuida independientemente en un 15% o más, preferentemente 50% o más, más preferentemente 100% o más, con relación a un producto alimenticio que ha sido tratado con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 10.
- 40 129. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-128, en el cual cada una de la firmeza y la friabilidad de un producto alimenticio tratado con el polipéptido está disminuida en comparación con un producto alimenticio que ha sido tratado con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 10.
130. Uso de un polipéptido como se describió en cualquiera de los ítems 1-129 como un aditivo para alimentos o piensos.
131. Un proceso para tratar un almidón, que comprende poner en contacto el almidón con un polipéptido como se describió en cualquiera de los ítems 1-129 y permitir que el polipéptido genere a partir del almidón uno o más productos lineales.
- 45 132. Uso de un polipéptido como se describió en cualquiera de los ítems 1-129 para preparar un producto alimenticio o de pienso.
133. Un proceso para la preparación de un producto alimenticio o de pienso que comprende mezclar un polipéptido como se describió en cualquiera de los ítems 1-129 con un ingrediente de un alimento o pienso.

134. Uso de acuerdo con los ítems 130, o un proceso de acuerdo con los ítems 133, en el cual el producto alimenticio comprende una masa o producto de masa, preferentemente un producto de masa procesado.
135. Un uso o proceso de acuerdo con cualquiera de los ítems 130 a 133, en el cual el producto alimenticio es un producto de panadería.
- 5 136. Un proceso para la preparación de un producto de panadería que comprende: (a) proporcionar un medio de almidón; (b) agregar al medio de almidón un polipéptido como se describió en cualquiera de los ítems 1-129; y (c) aplicar calor al medio de almidón durante o después del paso (b) para producir un producto de panadería.
137. Un producto alimenticio, producto de pienso, producto de masa o un producto de panadería obtenido por un proceso de acuerdo con cualquiera de los ítems 130 a 136.
- 10 138. Una composición de mejorador para una masa, en la cual la composición de mejorador comprende un polipéptido como se describió en cualquiera de los ítems 1-129, y al menos otro ingrediente de masa o aditivo de masa.
139. Una composición que comprende una harina y un polipéptido como se describió en cualquiera de los ítems 1-129.
- 15 140. Uso de un polipéptido como se describió en cualquiera de los ítems 1-129, en un producto de masa para retardar o reducir el enranciamiento, preferentemente la retrogradación perjudicial, del producto de masa.
141. Uso de un polipéptido como se describió en cualquiera de los ítems 1-129, en un producto de masa para mejorar una cualquiera o más de la firmeza, la resistencia, la cohesividad, la friabilidad o la capacidad de plegado del producto de masa.
- 20 142. Una combinación de un polipéptido como se describió en cualquiera de los ítems 1-129, junto con una cualquiera o más de las siguientes:
- a. alfa-amilasa maltogénica, también denominada glucano 1,4- $\alpha$ -maltohidrolasa (EC 3.2.1.133) de *Bacillus stearothermophilus*, o una variante, homólogo, o mutantes de ésta, que tiene actividad alfa-amilasa maltogénica;
- 25 b. una xilanasa de panadería (EC 3.2.1.8) de, por ejemplo, *Bacillus* sp., *Aspergillus* sp., *Thermomyces* sp. o *Trichoderma* sp.;
- c.  $\alpha$ -amilasa (EC 3.2.1.1) de *Bacillus amyloliquefaciens* o una variante, homólogo, o mutantes de ésta, que tiene actividad alfa-amilasa; y
- d. una lipasa tal como glicolipasa de *Fusarium heterosporum*.
- 30 143. Uso de una combinación de acuerdo con los ítems 142 para una aplicación de acuerdo con cualquier ítem precedente.
144. Un producto alimenticio o de pienso producido por tratamiento con una combinación de acuerdo con los ítems 142.
145. Un ácido nucleico capaz de codificar un polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1 a 129.
- 35 146. Un ácido nucleico de acuerdo con los ítems 145 que tiene una secuencia de ácido nucleico que es al menos 78% idéntica a la SEQ ID NO: 52.
147. Un ácido nucleico que comprende un fragmento de al menos 60 residuos de un ácido nucleico de acuerdo con los ítems 145 o 146 que es capaz de codificar un polipéptido que tiene exoactividad amilasa no maltogénica.
148. Un plásmido que comprende un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de los ítems 145 a 147.
- 40 149. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de los ítems 145 a 147, o capaz de expresar un polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1 a 129.
150. Una célula huésped que comprende, preferentemente transformada con, un plásmido de acuerdo con los ítems 148 o un vector de expresión de acuerdo con los ítems 149.
151. Una célula capaz de expresar un polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1 a 129.
- 45 152. Una célula huésped de acuerdo con los ítems 150, o una célula de acuerdo con los ítems 151, que es una célula bacteriana, fúngica o de levadura.



## ES 2 604 666 T3

153. Un método de expresión de un polipéptido, método que comprende obtener una célula huésped o una célula de acuerdo con los ítems 150, 151 ó 152 y expresar el polipéptido de la célula o célula huésped, y opcionalmente purificar el polipéptido.
- 5 154. Un método para producir un polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1 a 129, método que comprende introducir una sustitución de aminoácido en la SEQ ID NO: 1 que tiene exoactividad amilasa no maltogénica, estando la sustitución de aminoácido
- a. en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 16, 48, 88, 97, 105, 205, 235, 240, 248, 266, 311, 347, 350, 362, 364, 369, 393, 395, 396, 400, 401, 403, 412 y 409 y/o
- 10 b. una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K/A/V/N/I/H/F, 34Q, 100Q/K/N/R, 272D, 392 K/D/E/Y/N/Q/R/T/G o 399C/H y/o
- c. en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 44, 96, 204, 354 y 377 y/o
- d. la siguiente sustitución de aminoácido: 392S.
155. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-129 que comprende la secuencia DGF-X1-AIW-X2-P-X3-PWRD-X4-SSW (SEQ ID NO: 38), en donde X1 es S o T, X2 es M o L, X3 es V o P y X4 es cualquier residuo de aminoácido que existe naturalmente, preferentemente un L-aminoácido, en las posiciones correspondientes a las posiciones 49-66 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.
156. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-129 y 155 que comprende la secuencia GGEGYFW (SEQ ID NO: 39) en las posiciones correspondientes a las posiciones 79-85 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.
- 20 157. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-129 y 155-156 que comprende la secuencia VPNH (SEQ ID NO: 40) en las posiciones correspondientes a las posiciones 114-117 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.
- 25 158. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-129 y 155-157 que comprende la secuencia CDDGD (SEQ ID NO: 41) en las posiciones correspondientes a las posiciones 150-154 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.
159. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-129 y 155-158 que comprende la secuencia AGGFRFDFVRG (SEQ ID NO: 42) en las posiciones correspondientes a las posiciones 187-197 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.
- 30 160. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-129 y 155-159 que comprende la secuencia FALK (SEQ ID NO: 43) en las posiciones correspondientes a las posiciones 256-259 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.
161. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-129 y 155-160 que comprende la secuencia WREVAVTFVDNHD (SEQ ID NO: 44) en las posiciones correspondientes a las posiciones 282-294 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.
- 35 162. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-129 y 155-161 que comprende la secuencia GYSPG (SEQ ID NO: 45) en las posiciones correspondientes a las posiciones 296-300 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.
- 40 163. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-129 y 155-162 que comprende la secuencia GQH (SEQ ID NO: 46) en las posiciones correspondientes a las posiciones 304-306 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.
164. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-129 y 155-163 que comprende la secuencia AYAYI (SEQ ID NO: 47) en las posiciones correspondientes a las posiciones 318-322 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.
- 45 165. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-129 y 155-164 que comprende la secuencia SPGTP (SEQ ID NO: 48) en las posiciones correspondientes a las posiciones 325-329 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.
166. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-129 y 155-165 que comprende la secuencia VYW (SEQ ID NO: 49) en las posiciones correspondientes a las posiciones 331-333 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.

167. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-129 y 155-166 que comprende la secuencia HMYDWG (SEQ ID NO: 50) en las posiciones correspondientes a las posiciones 335-340 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.
- 5 168. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1-129 y 155-167 que comprende la secuencia HGGDEIILQFHWN (SEQ ID NO: 37) en las posiciones correspondientes a las posiciones 13-26 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.
169. A método para producir un polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1 a 129 y 155-167, método que comprende introducir una sustitución de aminoácido en la SEQ ID NO: 1 que tiene exoactividad amilasa no maltogénica, estando la sustitución de aminoácido en una o más de las siguientes posiciones: 88, o 205 y/o siendo una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K, 235H/K/R, 240E, 392 K/D/E/Y o 409E.
- 10 170. Un método para preparar un jarabe de sacárido, que comprende agregar un polipéptido de acuerdo con cualquiera de los ítems 1 a 129 y 155-167 a un licuado de almidón granular para formar el jarabe de sacárido.
171. El método del ítem 170, en donde el licuado de almidón granular es producido por una alfa-amilasa.
172. El método del ítem 170, en donde el licuado de almidón granular es un licuado producido por ácido.
- 15 173. El método del ítem 170, en donde el licuado de almidón granular se obtiene de almidón de maíz, mazorcas, trigo, cebada, centeno, milo, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, arroz, arvejas, porotos, bananas o papas.
174. El método del ítem 170, en donde el licuado de almidón granular es sacarificado a 55 °C a 65 °C.
175. El método del ítem 170, en donde el licuado de almidón granular es sacarificado a 60 °C a 65 °C.
176. El método del ítem 170, en donde el licuado de almidón granular es sacarificado a pH 5,0 a pH 7,0.
- 20 177. El método del ítem 170, que comprende además una etapa de agregar una enzima que tiene actividad desramificadora al licuado de almidón granular.
178. El método del ítem 177, en donde la enzima que tiene actividad desramificadora es una isoamilasa, una pululanasa, una isopululanasa, una neopululanasa o cualquier combinación de éstas.
- 25 179. El método del ítem 177, que comprende opcionalmente una etapa adicional de agregar una proteasa, una celulasa, una hemicelulasa, una lipasa, una cutinasa, una pectato liasa o cualquier combinación de éstas al almidón granular.
180. El método del ítem 170, en donde el jarabe de sacárido comprende al menos 35% en peso de maltotetraosa en base al contenido total de sacárido.
- 30 181. El método del ítem 180, en donde el jarabe de sacárido comprende al menos 45% en peso de maltotetraosa en base al contenido total de sacárido.
182. El método del ítem 181, en donde el jarabe de sacárido comprende al menos 50% en peso de maltotetraosa en base al contenido total de sacárido.
183. El método del ítem 182, en donde el jarabe de sacárido comprende de 40% en peso a 60% en peso de maltotetraosa en base al contenido total de sacárido.

### 35 Ejemplos

#### Ejemplo 1. Clonación de PS4 y G4-amilasas

Se cultivó *Pseudomonas sacharophila* durante la noche en medio LB y se aisló ADN cromosómico por métodos estándar (Sambrook J, 1989). Un fragmento de 2190 bp que contenía el marco de lectura abierto PS4 (Zhou *et al.*, 1989) se amplificó de ADN cromosómico de *P. sacharophila* por PCR usando los cebadores P1 y P2 (ver Tabla 3).

40 El fragmento resultante se usó como un molde en una PCR anidada con los cebadores P3 y P4, amplificando el marco de lectura abierto de PS4 sin su secuencia señal e introduciendo un sitio NcoI en el extremo 5' del gen y un sitio BamHI en el extremo 3'. Junto con el sitio NcoI se introdujo un codón para una metionina N-terminal, permitiendo la expresión intracelular de PS4. El fragmento de 1605 bp se clonó en pCRBLUNT TOPO (Invitrogen) y se analizó la integridad del constructo por secuenciación. El vector transportador del *Bacillus E.coli* pDP66K (Penninga *et al.*, 1996) se modificó para permitir la expresión del PS4 bajo control del promotor P32 y la secuencia señal *ctg*asa. El plásmido resultante, pCSmta es transformado en *B. subtilis*.

45

Se preparó un segundo constructo de expresión en el cual se removió el dominio de ligación de almidón de PS4. En una PCR con los cebadores P3 y P6 (Tabla 3) en pCSmta, se generó una versión truncada del gen mta. El gen mta de longitud completa en pCSmta se intercambió con la versión truncada que resultó en el plásmido pCSmta-SBD.

Amilasas G4 de *Pseudomonas* sp. AM1 (2006), *Pseudomonas* sp. 7193, *Pseudomonas mendocina* (cepa ymp) y *Hahella chejuensis* (cepa KCTC 2396) fueron clonadas en un vector de expresión de *Bacillus* con la secuencia señal por síntesis de genes (GeneScript; NJ, USA) de las secuencias que codifican las proteínas maduras con un M agregado en el extremo N como se muestra en las SEQ ID NO 3, 5, 7 y 9.

5 Ejemplo 2. Mutagénesis dirigida a un sitio

La mutagénesis dirigida a un sitio se usó para producir polipéptido variante como se divulga en la presente. Las mutaciones fueron introducidas en un ácido nucleico que codifica pMS 382 que tiene la SEQ ID: 1, usando el método Quick Change™ (Stratagene, California), de acuerdo con las instrucciones suministradas con el kit con algunas modificaciones. Brevemente, se tomó una sola colonia y se inoculó en 3 ml de LB (22 g/l de Caldo Base Lennox L, Sigma) suplementado con 50 µg/ml de kanamicina (Sigma) en un tubo Falcon de 10 ml. Después de incubación durante la noche a 37 °C a 200 rpm, el cultivo fue centrifugado a 5000 rpm durante 5 min. El medio fue removido y se preparó un molde de ADN de doble hebra usando columnas de QIAGEN (QIAGEN). Los cebadores fueron diseñados de acuerdo con el protocolo del fabricante. Por ejemplo, la TABLA 1 indica los cebadores que se usaron para generar nuevas variantes basadas en la secuencia de nucleótidos de pMS382 como se muestra en la SEQ ID NO: 52.

A continuación se realizó una PCR para sintetizar la hebra mutante. La mezcla de reacción de la PCR contenía lo siguiente:

2.5 • l 10 X QuickChange tampón de multirreacción

0.75 • l QuickSolution

20 X • l cebadores (10 pmoles para los cebadores de 28-35 nt; 7 pmoles para los cebadores de 24-27 nt; o 5 pmoles para los cebadores de 20-23 nt)

1 • l mezcla de dNTP

X • l molde de ds-ADNe (200 ng)

1 • l QuickChange mezcla de multienzimas (2.5 U/• l) (PfuTurbo ADN polimerasa)

25 X • l dH<sub>2</sub>O (hasta un volumen final de 25 • l)

La reacción de PCR se realizó en un ciclador térmico Eppendorf durante 35 ciclos de desnaturalización (96°C durante 1 min), reasociación de cebadores (62,8°C durante 1 min), y alargamiento (6°C durante 15 min), y luego se mantuvo a 4°C. Para cada reacción de amplificación se agregaron 2 • l de enzima de restricción DpnI (10 U/• l), y la mezcla se incubó a 37°C durante ~ 3 hs.

30 El ADN tratado con DpnI se usó luego para transformar células ultracompetentes XL10-Gold® (Stratagene). Las células XL10-Gold® fueron descongeladas en hielo. Para cada reacción de mutagénesis se agregaron 45 • l células a un tubo Falcon preenfriado. Subsiguientemente, se agregaron 2 • l de mezcla de beta-mercaptoetanol a cada tubo. La mezcla se incubó en hielo durante 10 min con haciéndola girar cada 2 min. Luego se agregaron 1,5 • l de ADN tratado con DpnI a cada alícuota de células, y la mezcla se incubó en hielo durante 30 min. La muestra fue sometida a un pulso térmico de 30 seg a 42°C, y se colocó en hielo durante otros 2 min. Se agregaron 0,5 ml de caldo NZY<sup>+</sup> precalentado a cada muestra y se llevó a cabo la incubación a 37°C durante 1 h con agitación a 225-250 rpm. Se colocaron en placas 200 • l de cada reacción de transformación sobre placas con LB (33,6 g/l de Lennox L Agar, Sigma) suplementado con 1% de almidón y 50 • g/ml de kanamicina. Las placas fueron incubadas durante la noche a 37°C. Se identificaron colonias individuales que alojaban las mutaciones deseadas por secuenciación de ADN y se sometieron a preps de plásmidos para cosechar plásmidos con las mutaciones deseadas.

Ejemplo 3. Transformación en *Bacillus subtilis*.

Se transformó *Bacillus subtilis* (cepa DB104A; Smith et al., Gene 70, 351-361 (1988)) con el ADN plásmido mutado de acuerdo con el siguiente protocolo.

A. Medios para preparación de protoplastos y transformación

2 x SMM por litro: 342 g sacarosa (1 M); 4,72 g de maleato de sodio (0,04 M); 8,12 g de MgC<sub>12</sub>·6H<sub>2</sub>O (0,04 M); pH 6,5 con NaOH concentrado. Distribuir en porciones de 50 ml y colocar en autoclave durante 10 min.

4 x YT (1/2 NaCl) 2 g de extracto de levadura + 3,2 g de Triptona + 0,5 g de NaCl por 100 ml.

## ES 2 604 666 T3

- SMMP                   mezclar volúmenes iguales de 2 x SMM y 4 x YT.
- PEG                    10 g de polietilenglicol 6000 (BDH) o 8000 (Sigma) en 25 ml
- 1 x SMM (Autoclave durante 10 min.).

### B. Medios para colocación en placas/regeneración

- agar                    4% Difco minimal agar. Autoclave durante 15 min.
- succinato de sodio   270 g/l (1 M), pH 7,3 con HCl. Autoclave durante 15 min.
- tampón fosfato       3,5 g de  $K_2HPO_4$  + 1,5 g de  $KH_2PO_4$  por 100 ml. Autoclave durante 15 min
- $MgCl_2$                 20,3 g de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  por 100 ml (1 M).
- casaminoácidos      solución al 5% (p/v). Autoclave durante 15 min.
- extracto de levadura   10 g por 100 ml, autoclave durante 15 min.
- glucosa                solución al 20% (p/v). Autoclave durante 10 min.

Medio de regeneración DM3: mezclar a 60 °C (baño de agua; frasco de 500 ml):

- 250 ml de succinato de sodio
- 50 ml de casaminoácidos
- 5   25 ml de extracto de levadura
- 50 ml de tampón fosfato
- 15 ml de glucosa
- 10 ml de  $MgCl_2$
- 100 ml agar fundido
- 10   Agregar antibióticos apropiados: cloranfenicol y tetraciclina, 5 • g/ml; eritromicina, 1 • g/ml. La selección en kanamicina es problemática en medio DM3: pueden requerirse concentraciones de 250 • g/ml.

### C. Preparación de protoplastos

Usar recipientes de plástico o de vidrio libres de detergente.

- 15   Inocular 10 ml de 2 x medio YT en un matraz de 100 ml de una sola colonia. Cultivar un cultivo de una noche a 25-30°C en un agitador (200 rev/min).
- Diluir el cultivo de una noche 20 veces en 100 ml de 2 x medio YT fresco (matraz de 250 ml) y cultivar hasta  $OD_{600} = 0,4-0,5$  (aprox. 2 hs) a 37°C en un agitador (200-250 rev/min).
- Cosechar las células por centrifugación (9000 g, 20 min, 4°C).
- 20   Remover el sobrenadante con una pipeta y volver a suspender las células en 5 ml de SMMP + 5 mg lisozima, filtrada en forma estéril.
- Incubar a 37 °C en un agitador en un baño de agua (100 rpm).
- 25   Después de 30 min y luego a intervalos de 15 min, examinar muestras de 25 • l por el microscopio. Continuar la incubación hasta que 99% de las células son formadas como protoplastos (aspecto globular). Cosechar los protoplastos por centrifugación (4000 g, 20 min, RT) y retirar con una pipeta el sobrenadante. Volver a suspender el pellet suavemente en 1-2 ml de SMMP.

## ES 2 604 666 T3

Los protoplastos están listos ahora para usar. Porciones (por ejemplo, 0,15 ml) pueden ser congeladas a -80 °C para uso futuro (no se requiere adición de glicerol). Aunque esto puede dar por resultado una cierta reducción de la capacidad de transformación, se pueden obtener 106 transformantes por ug de ADN con protoplastos congelados).

### D. Transformación

- 5 Transferir 450 • l de PEG a un microtubo.

Mezclar 1-10 • l de ADN (0,2 • g) con 150 • l de protoplastos y agregar la mezcla al microtubo con PEG. Mezclar inmediatamente, pero suavemente.

Dejar durante 2 min a temperatura ambiente, y luego agregar 1,5 ml de SMMP y mezclar.

- 10 Cosechar los protoplastos por microcentrifugado (10 min, 13.000 rpm (10.000-12.000 g)) y retirar el sobrenadante. Remover las gotas remanentes con un papel tisú.

Agregar 300 • l de SMMP (no agitar en torbellino) e incubar durante 60-90 min a 37 °C en un agitador con baño de agua (100 rpm) para permitir la expresión de marcadores de resistencia a antibióticos. (Los protoplastos son suficientemente resuspendidos a través de la acción de agitación del baño de agua). Realizar diluciones apropiadas en 1 x SSM y colocar en placas 0,1 ml en placas de DM3.

- 15 Ejemplo 4. Fermentación de variantes en matraces de agitación.

El sustrato del matraz de agitación es preparado disolviendo lo siguiente en agua:

Extracto de levadura	2% (p/v)
Harina de soja	2% (p/v)
NaCl	0,5% (p/v)
Fosfato dipotásico	0,5% (p/v)
Agente antiespumante	0,05% (p/v)

- 20 El sustrato se ajustó a pH 6,8 con ácido sulfúrico 4 N o hidróxido de sodio antes de colocar en autoclave. Se colocaron 100 ml de sustrato en un matraz de 500 ml con un baffle y se colocó en autoclave durante 30 minutos. Subsiguientemente, se agregaron 6 ml de jarabe de dextrosa estéril. El jarabe de dextrosa es preparado mezclando un volumen de 50% p/v de dextrosa con un volumen de agua seguido por colocación en autoclave durante 20 minutos.

- 25 Los matraces de agitación son inoculados con las variantes e incubados durante 24 horas a 35°C y 180 rpm en una incubadora. Después de la incubación se separan las células del caldo por centrifugación (10.000 g en 10 minutos) y finalmente, se retiran las células del sobrenadante por microfiltración a 0,2 µm. El sobrenadante libre de células se usa para ensayos y ensayos de aplicación.

Tabla 1. Cebadores usados para generar variantes en base a la secuencia de nucleótidos de pMS382 como se muestra en la SEQ ID NO: 52.

Mutación	5' Oligosecuencia 3'	Modificación	Hebra	Propósito
Q42K	GTATAACATCCTGAGACAAAaaGCGAGCACAATTGC CG	5' fosfato	+	MSDM
Q42N	GTATAACATCCTGAGACAAAaacGCGAGCACAATTGC C	5' fosfato	+	MSDM
R88L	GCATGACTTTAACAAAAACGGCctgTATGGAAGCGA TGCTC	5' fosfato	+	MSDM
R88Y	GGCATGACTTTAACAAAAACGGCtatTATGGAAGCG ATGCTCAAC	5' fosfato	+	MSDM
L88K	GGCATGACTTTAACAAAAACGGCaaaTATGGAAGC GATGCTCAAC	5' fosfato	+	MSDM
S205L	GCCCCGAAAGAGTTGATctgTGGATGAGCGATTCA GCG	5' fosfato	+	MSDM

Mutación	5' Oligosecuencia 3'	Modificación	Hebra	Propósito
T235R	GTGGGATTGGAGAAATagaGCGAGCTGGCAGC	5' fosfato	+	MSDM
T235K	GTGGGATTGGAGAAATaaaGCGAGCTGGCAGC	5' fosfato	+	MSDM
T235H	GCCGTGGGATTGGAGAAATcatGCGAGCTGGCAGC AG	5' fosfato	+	MSDM
T235Q	CCGTGGGATTGGAGAAATcagGCGAGCTGGCAGCA G	5' fosfato	+	MSDM
Q240E	CGCTCCAATCTTTGATGATTTCTGCCAGCTCGCTG	5' fosfato	-	MSDM
Q240D	CAGCGAGCTGGCAGgatATCATCAAAGATTGGAGC G	5' fosfato	+	MSDM
Q311P	CAACATAAATGGCCGCTTccgGATGGCCTTATCAGA CAG	5' fosfato	+	MSDM
A392D	GCCCTGAATAGCGATCTGgatAATCCGGGACAAGTT GC	5' fosfato	+	MSDM
A392Y	CGCCCTGAATAGCGATCTGtatAATCCGGGACAAGT TGCTAG	5' fosfato	+	MSDM
S409E	GCGAAGCAGTCAATGCCgaaAATGGCCAAGTCAGA GTCTG	5' fosfato	+	MSDM
R248H	CATCAAAGATTGGAGCGATcatGCAAAATGCCCCG GTCTTTGAC	5' fosfato	+	MSDM
S266T	CGCATGCAAAATGGAacgGTCGCCGATTGGAAAC ATG	5' fosfato	+	MSDM
S377D	CTACAGTTgatGGCAGCCAACAAAC	5' fosfato	+	MSDM

## Ejemplo 5. Ensayos de amilasa

## Ensayo de Betamyl

Una unidad Betamyl se define como la actividad que degrada 0,0351 mmoles por 1 min de maltopentaosa acoplada con PNP de tal modo que 0,0351 mmoles de PNP por 1 min pueden ser liberados por exceso de alfa-glucosidasa en la mezcla de ensayo. La mezcla de ensayo contiene 50 ul de 50 nM citrato de Na, 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, pH 6,5 con 25 ul de muestra de enzima y 25 ul de sustrato Betamyl (Glc5-PNP y alfa-glucosidasa) de Megazyme, Irlanda (1 vial disuelto en 10 ml de agua). La mezcla de ensayo se incubó durante 30 min a 40°C y luego se detuvo agregando 150 ul de 4% Tris. Se midió la absorbancia a 420 nm usando un lector ELISA y se calculó la actividad de Betamyl en base a la Actividad = A<sub>420</sub> \* d en unidades Betamyl/ml de muestra de enzima ensayada. Para la dosificación en los ensayos de horneado se usaron 1 BMK = 1000 unidades Betamyl.

## Ensayo de endo-amilasa

El ensayo de endo-amilasa es idéntico al ensayo Phadebas realizado de acuerdo con el fabricante (Pharmacia & Upjohn Diagnostics AB).

## Exo-especificidad

La relación entre la exo-actividad de amilasa y la actividad de Phadebas se usó para evaluar la exo-especificidad.

## Ejemplo 6. Determinaciones de estabilidad térmica del procedimiento basadas en la actividad residual

Las muestras de enzimas en diluciones apropiadas fueron incubadas en 50 mM de tampón acetato de Na, pH 5,0 con 0,5 M de NaCl a temperatura ambiente (control) o durante 4 minutos a 80°C (muestra calentada), e inmediatamente después que la muestra control y la muestra calentada fueron analizadas usando el ensayo Betamyl. La actividad residual se calculó como la actividad Betamyl de la muestra calentada dividido por la actividad Betamyl de la muestra control.

## Ejemplo 7. Efectos estabilizadores de mutaciones

Usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 6 los efectos estabilizadores de las mutaciones Q42K, R88L, S205L, E223S, Q311P, S409E y T235K se muestran en la Tabla 2 como un aumento de la actividad residual después del calentamiento. De igual forma el efecto estabilizador de A392D se muestra en la Tabla 3, de S205L, S223A y S205L combinado con S409 en la Tabla 4, de N34Q y G100Q en la Tabla 5 y de Q240E en la Tabla 6. En

las tablas 2-6, las variantes tienen la misma secuencia que la mencionada en la primera línea excepto para la o las mutaciones ulteriores realizadas como se describió en la segunda columna.

Tabla 2. Efecto estabilizador de Q42K, R88L, S205L, E223S, Q311P, S409E y T235K combinados con Q311P

Variante	Mutación ulterior en pMS382	Actividad residual (%)
pMS382 (SEQ ID NO: 1)		8,4
pMS465 (SEQ ID NO: 18)	E223S	9,6
pMS1042 (SEQ ID NO: 19)	Q31 1 P	13,1
pMS1104 (SEQ ID NO: 20)	Q42K	11,2
pMS1153 (SEQ ID NO: 21)	R88L	19,5
pMS1286 (SEQ ID NO: 22)	T235R	12,3
pMS1284 (SEQ ID NO: 23)	T235R, Q31 1 P	17,2
pMS1290 (SEQ ID NO: 24)	T235K	14,1
pMS1484 (SEQ ID NO: 25)	S205L	8,8
pMS1579 (SEQ ID NO: 26)	S409E	16,4

Tabla 3. Efecto estabilizador de A392D

Variante	Mutación ulterior en pMS1105	Actividad residual (%)
pMS1105 (SEQ ID NO: 27)		11,0
pMS1723 (SEQ I D NO: 28)	A392D	12,3

5

Tabla 4. Efecto estabilizador de S205L, S223A y S205L combinado con S409E

Variante	Mutación ulterior en pMS1776	Actividad residual (%)
pMS1776 (SEQ ID NO: 12)		18,9
pMS2104 (SEQ ID NO: 29)	S223A	22,1
pMS2138 (SEQ I D NO: 30)	S205L	22,4
pMS2022 (SEQ ID NO: 15)	S205L, S409E	23,3

Tabla 5. Efecto estabilizador de N34Q y G100Q

Variante	Mutación ulterior en pMS2124	Actividad residual (%)
pMS2124 (SEQ ID NO: 31)		24,7
pMS2177 (SEQ I D NO: 32)	N34Q	28,8
pMS2178 (SEQ I D NO: 33)	G100Q	26,4

Tabla 6. Efecto estabilizador de Q240E

Variante	Mutación ulterior en pMS2022	Actividad residual (%)
pMS2022 (SEQ ID NO: 15)		23,3
pMS2118 (SEQ I D NO: 34)	Q240E	26,8

Ejemplo 10. Receta para los ensayos de horneado

10 Los ensayos de horneado fueron llevados a cabo con una receta de esponja (prefermento) y masa de pan blanco estándar para el pan de tostada de Estados Unidos. La masa de esponja es preparada a partir de 1500 g de harina "Gold Medal" de General Mills, USA, 890 g de agua, 40 g de aceite de poroto de soja, 7,5 g de GRINDSTED™ SSL P55 Veg, 10 g de emulsionante DIMODAN™ PH300, 26 g de levadura seca y ácido ascórbico (20 ppm de concentración final). La esponja es mezclada durante 1 min a baja velocidad y subsiguientemente 3 min a velocidad

2 en un mezclador de espiral Hobart. La esponja es fermentada subsiguientemente durante 3 horas a 25 °C, 85% de HR.

5 Luego se agregan a la esponja 500 g de harina "Gold Medal", 14 g de levadura seca, 5 g de propionato de calcio, 240 g de jarabe de maíz alto en fructosa (42%), 5 g de propionato de calcio, 250 g de agua y ácido ascórbico (30 ppm de concentración final) y 40 g de sal. La masa resultante se mezcla durante 0,5 min a baja velocidad y luego durante 10,5 min a alta velocidad en un mezclador de espiral Hobart.

La masa se deja descansar durante 5 min a temperatura ambiente, y luego trozos de masa de 794 g son pesados, moldeados en un moldeador de grano cruzado y transferido a recipientes. Después de 60 min de fermentación a 43 °C a 80% HR las masas son horneadas durante 21 min a 200 °C en un horno de bandejas Reed.

10 Ejemplo 11. Protocolo para la evaluación de la firmeza, la resistencia y la cohesividad

Análisis del perfil de textura del pan

15 La firmeza, la resistencia y la cohesividad son determinadas analizando rebanadas de pan por el Análisis de Perfil de Textura usando un Analizador de Textura de Stable Micro Systems, Reino Unido. El cálculo de la firmeza, la resistencia, y la cohesividad se realiza de acuerdo con el estándar prefijado suministrado por Stable Micro System, Reino Unido. La sonda usada es redonda de aluminio de 50 mm.

La firmeza es determinada a 40% de compresión durante la primera compresión. La cifra es la fuerza requerida para comprimir la rebanada al 40% del espesor total. Cuanto más bajo el valor, más blando es el pan. La firmeza se expresa, por ejemplo, en gramos.

Ejemplo 12. Evaluación de los efectos antiranciamiento de los polipéptidos variantes de amilasa G4

20 El pan fue horneado como se describió en el Ejemplo 10 con pMS1776, pMS1934, pMS2020, pMS2022 y pMS2062 en dosificaciones que variaban de 7,5 a 20 BMK/kg correspondientes a 7.500 a 20.000 unidades Betamyl/kg.

La firmeza del pan es testeada de acuerdo con el protocolo presentado en el Ejemplo 11 a diversos tiempos después del horneado. Como controles, también se horneó pan horneado con dosificaciones estándar de 600 ppm de Novamyl 1500 y/o 416,66 ppm de una composición que comprende la SEQ ID NO: 1.

25 Las Figs. 1 y 2 muestran los resultados de la firmeza. Con relación a los controles con dosificaciones estándar de 600 ppm de Novamyl 1500 y/o 416,66 ppm de una composición que comprende la SEQ ID NO: 1, se obtiene una reducción mucho más fuerte en la tasa de firmeza del día 3 al día 10 después del horneado con pMS1776, pMS1934, pMS2020, pMS2022 y pMS2062. Estos panes también habían mejorado mucho en cuanto a resistencia y la cohesividad con relación a los controles.

30 Esto indica que los polipéptidos variantes, como se describió en la presente mejoraron mucho los efectos anti-enranciamiento en comparación con Novamyl 1500 y una composición que comprende la SEQ ID NO: 1.

Ejemplo 13. Protocolo para la evaluación de la friabilidad (Resistencia a la friabilidad)

Dos rebanadas de pan son colocadas sobre un trozo de papel. Cada rebanada es dividida en 4 cuadrados mediante rupturas verticales y subsiguientemente horizontales de la rebanada.

35 La ruptura se realiza desmenuzando la miga con los dedos. Primero se separa la rebanada del centro de la superficie superior del pan al centro de la superficie inferior del pan. Luego, cada mitad de la rebanada original se separa del lado de la corteza al interior de la rebanada. Los pequeños trozos de miga, que son separados de los 4 cuadrados, son retirados agitando cada trozo al menos 3 veces moviendo la mano hacia arriba y hacia abajo.

40 El peso de los pequeños trozos de miga separados es determinado como una medida de la friabilidad. Este ensayo puede ser denominado "Protocolo de evaluación de la friabilidad".

Ejemplo 14. Protocolo para la evaluación de la capacidad de plegado

El pan para tostadas es cortado usando un cortador de pan automático con un espesor de rebanada prefijado de 15 mm. La rebanada es plegada a mano desde la parte superior de la rebanada hacia la parte inferior, de tal modo que la dirección del pliegue es de lado a lado.

45 La capacidad de plegado es evaluada visualmente usando el siguiente sistema de puntuación:

Resultado	Característica
1	No plegable, la rebanada se rompe al plegar
2	Plegable, toda la rebanada se rompe dentro de 5 segundos después del plegado



## ES 2 604 666 T3

Resultado	Característica
3	Plegable, parte de la rebanada se rompe dentro de 5 segundos después del plegado. Otras partes se rompen después.
4	Plegable, parte de la rebanada se rompe después de 5 segundos después del plegado. Otras partes no se rompen.
5	Plegable, ninguna parte de la rebanada se rompe después del plegado.

Este ensayo puede ser denominado "Protocolo de evaluación de la capacidad de plegado".

Ejemplo 15. Preparación de jarabe DP4

Materiales:

5 SPEZYME FRED® licuado de almidón de maíz granular (34%ds, 9.1DE) tratado con alfa-amilasa bacteriana (Danisco US Inc., Genencor Division).

Pululanasa (OPTIMAX L-1000, Danisco US Inc., Genencor Division)

Experimental:

10 Se ajustó el pH del licuado de almidón a 5,2 con NaOH y luego cada 100 g de licuado fue incubado a 60°C durante la sacarificación con DP4 dosificando enzimas a 0,03 BMK/gds. Cuando se usó pululanasa, se dosificó a 0,5 ASPU/gds. La reacción se llevó a cabo hasta 40 horas, se detuvo para el muestreo periódico para chequear el DP4 máximo. Cuando se observó el DP4 máximo, se detuvo la reacción calentando en agua hirviendo.

Resultados:

Tabla 1.

Producción (%)	Hs	% DP1	% DP2	% DP3	% DP4	% DP5	% DP6	% DP7	% DP8	% DP9	% DP10	% DP11+
pMS2062	16	2,31	5,50	8,67	38,00	0,81	0,17	0,67	0,99	3,23	0,39	39,30
pMS2062+PU		2,42	5,70	8,99	38,12	1,06	0,19	0,85	1,29	4,10	1,06	36,20
pMS2062	19,5	2,49	5,73	9,03	39,86	0,63	0,00	0,51	0,83	2,62	0,38	37,90
pMS2062+PU		2,60	5,89	9,45	40,37	0,88	0,00	0,70	1,18	3,65	1,19	34,10
pMS2062	22	2,59	5,69	9,20	41,16	0,56	0,00	0,45	0,75	2,27	0,37	37,00
pMS2062+PU		2,81	5,95	9,91	41,96	0,78	0,00	0,58	1,02	3,30	1,26	32,40
pMS2062	40	3,41	6,32	10,47	43,76	0,24	0,12	0,16	0,87	0,30	0,20	34,10
pMS2062+PU		3,67	7,01	11,42	45,80	0,43	0,26	0,42	2,22	1,87	0,17	26,70

Como se muestra en la Tabla 1, los resultados indicaron que PMS2062 produjo un DP4 como un producto de azúcar principal. Como también se indicó, la adición de pululanasa (PU) (PMS2062 + PU) dio por resultado una reducción más rápida de los azúcares superiores (ver, por ejemplo, DP11+), mientras que el nivel de DP4 fue afectado mínimamente.

5 **Secuencias**

SEQ ID NO: 1. Secuencia de proteínas maduras de pMS382

DQAGKSPAGVRYHGGDEII LQGFHWNVREAPYNWYNILRQOASTIAADGFSAIWMPVWPWRDFSSWTDGDKSGGGEGYFWHDF  
 NKNGRYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVPNHMNRFPDKEINLPAGQRFWRNDPCDPGNGPNDCCDDGDRFLGGEADLNTG  
 HPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFDFVVRGYAPERVDSWMSDSADSSFCVGEWKEPSEYPPWDRNTASWQQI IKDWSRA  
 KCPVDFALKERMONGSVADWKHGLNPNPDRWREVAVTFVDNHDGTGSPGQNGGQHKWPLQDGLIRQAYAYILTSPGTPVY  
 WPHMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSYSGLVATVSGSQQTLVVALNSDLANPGQVASGSFSEAVNASNGQVRV  
 WRSGGDGGGNDGG

SEQ ID NO: 2. Proteína madura de amilasa G4 de Pseudomonas sp. AM1 (2006) con M agregado en el extremo N (proteína Q1EJP2):

1	MDLAGKSPGG	VRYHGGDEII	LQGFHWNVIR	ESPNNWYNTL	RDMAPTIAAD
51	GFSAIWMPVP	WRDFSSWSWG	ANSGGGEGYF	WHDFNKNGRY	GSDTQLKQAA
101	GALNNAQVKV	LYDVVPNHMN	RGYPDKQINL	PAGQGFWRND	CADPGNYPNP
151	CDDGDRFMGG	DADLNTANPQ	VYGMFRDEFA	NLRSNYGAGG	FRFDFVRGYA
201	GERVDSWMGA	AHDNAFCVGE	LWKAPAEYPS	WDRNTASWQ	QVIKDWSDRA
251	KCPVDFALK	ERMONGSIAD	WKNGLNPNP	PRWREVAVTF	VDNHDAGYSP
301	GQNGGQHHWA	LQDGLIRQAY	AYILTSPGTP	VVYWSHMYDW	GYGDFIRQLI
351	QVRRTAGVRA	DSAISFHSY	SGLVATVSGS	QQTLVVALNS	DLANPGQVAS
401	GSFSEAVNAS	NGQVRVWRS	SGDGGGNDGG	EGGLVNVNFR	CDNGVTQMGD
451	SVYAVGNVSQ	LGNWSPASAV	RLTDTSSYPT	WKGSIALPDG	QNVEWKCLIR
501	NEADATLVRQ	WQSGGNQVQ	AAAGASTSGS	F*	

10

SEQ ID NO: 3. Secuencia de ADN de nucleótido que codifica la amilasa G4 de Pseudomonas sp. AM1 (2006) (Q1EJP2) con M agregado en el extremo N (ADN de Q1EJP2):

atggatctggcaggcaaatcaccggcgcgcttagatcatggcgccgatgaaattattctgcaaggctttcattggaatgt  
 tattagagaatcaccgaataattggtataat acactgagagat atggcaccgacaattgcagcagatggcttttcagcaattt  
 ggatgccgggtccgtggagagat ttttcatcatgggtcagatggcgcaaatcaggcgccggcgaaggctat ttttggcatgat  
 ttttaataaaaaatggcagat atggctcagat acacaactgaaacaagcagcaggcgact gaataatgcacaagttaaagtctt  
 gtatgatgttgtccgaatcatatgaatagaggctatccggat aaacaaat taaatctgccggcaggccaaggct tttggagaa  
 atgattgcccagatccgggcaattatccgaatgattgcccagatggcgatagattt atggcgccgatgctgatctgaataca  
 gcaaatccgcaagtttatggcatgtttagagatgaatttgcaaatctgagatcaaatatggcgccaggcgcttttagatttga  
 ttttggtagaggctatgcaggcgaaagagttgattcatggatggcgccagcacatgataatgcattttgcttggcgaaactgt  
 ggaaagcaccggcagaat atccgtcatgggattggagaaat acagcatcatggcaacaagttat taaagattgggtcagataga  
 gcaaaatgcccggtttttgattttgcaactgaaagaaagaatgcaaaatggctcaattgcagattggaaaaatggcctgaatgg  
 caatccggatccgagatggagagaagttgcagttacatttgttgataatcatgatgcaggctatccaccggccaaaaatggcg  
 gccaacatcat tgggactgcaagatggcctgattagacaagcatatgcatat atctgacatcaccgggcacaccgggttgtt  
 tattggtcacat atgtatgattggggctatggcgattttat tagacaactgattcaagttagaagaacagcaggcgcttagagc  
 agattcagcaatttcatttcattcaggctatccaggcctggttgcaacagtttcaggctcacaacaaactggttgttgccac  
 tgaatagcgatctggcaaatccgggccaagttgcatcaggctcat tttcagaagcagttaatgcatcaaatggccaagttaga  
 gtttggagatcaggctcaggcgatggcgccggcaatgatggcgccgaaggcggcctggttaattgtaatttt agatgcgataa  
 tggcgcttacacaaatggcgatcagtttatgcagttggcaatgtttcacaactgggcaattgggtcaccggcatcagcagtt  
 gactgacagat acatcatcatatccgacatggaaaggctcaattgcaactgccggatggccaaaatgttgaatggaaatgctg  
 attagaaatgaagcagatgcaacactggttagacaatggcaatcaggcgcccaat aatcaagttcaagcagcagcaggcgcatc  
 aacatcaggctcatttttaa

## ES 2 604 666 T3

SEQ ID NO: 4. Proteína madura de amilasa G4 de *Pseudomonas* sp. 7193 con M agregado en el extremo N (proteína A5CVD5):

```

1   MDLAGKSPGG VRYHGGDEII LQGFHWNVIR ESPNNWYNTL RDMAPTIAAD
51  GFSAIWMPVP WRDFSSWSDG ANSGGEGEYF WHDFNKNGRY GSDTQLKQAA
101 GALNNAQVKV LYDAVPNHMN RGYDPKQINL PAGQGFWRND CADPGNYPNP
151 CDDGDRFMGG DADLNTANPQ VYGMFRDEFA NLRSNYGAGG FRFDFVIRGYA
201 GERVDSWMDG GACQRLLRGR ALEGTGRIPE LGLAQYQQLA AVIKDWSRA
251 KVPGCSNFAL KGAAHAERLPS PTGRTASTAT PMPRWREVAV TFVDNHDTGY
301 SPQNGGQHH WALRDDLVLRQ AYAYILASPG TPVVYWSHMY DWGHGFLIRQ
351 LIQIRRAAGV RADSIAIEFHS GYSGLVATVR GTAQTLVMAL GSNLSSPAEV
401 SSGSFSQALN QDSGQLRIWT TGSTGGDEGD GGGDGTMSVSV NFRCDNGITQ
451 PGDSVYAVGS LAQLGSWSPA NAVRLTDVSN YPTWKGAISL PAGQAVEWKC
501 IVRSEADFTQ VRQWQAGDNN RVTAGAGATT IGRL*

```

5 SEQ ID NO: 5. Secuencia de ADN de nucleótido que codifica la amilasa G4 de *Pseudomonas* sp. 7193 (A5CVD5) con M agregado en el extremo N (A5CVD5 DNA):

```

atggatctggcaggcaaatcaccggcgccgcttagatcatcggcggcgatgaaattattctgcaaggcttccattggaatgt
tattagagaatcaccgaataattggtataatacactgagagatggcaccgacaattgcagcagatggcttttcagcaattt
ggatgccggtccgctggagagattttcatcatggcagatggcgcaaatcaggcggcggaaggctatttttggcatgat
tttaataaaaaatggcagatggctcagatcacacaactgaaacaagcagcagcgcactgaataatgcacaagttaaagtct
gtatgatgcagttccgaatcatatgaatagaggctatccggataaacaaatataatctgccggcaggccaaggcttttggagaa
atgattgcgagatccgggcaattatccgaatgattgcatgatggcgatagatttatggcgccgcatgctgatctgaataca
gcaaatccgcaagtttatggcatgtttagagatgaatttgcaaatctgagatcaaatatggcgccaggcggcttttagatttga
ttttgttagaggctatgcaggcgaagagattgattcatggatggcgatggcgcatgccaagactgctgagaggcagagcac
tggaaaggcacaggcagaattccggaactgggctggcacaataggccaactggcagcagttattaagattggtcagataga
gcaaaagtccgggctgctcaattttgcaactgaaaggcgcacatgcagaaagactgccgtcaccgacaggcagaacagcatc
aacagcaaacaccgatgccagatggagagaagttgcagttacatttggttgatataatcatgatacaggctatccaccggcaca
atggcggccaacatcatgggcaactgagagatgatctggttagacaagcatatgcatatattctggcatcaccgggcacaccg
ggttgtttattggtcacatatgtatgattgggggtcatggaccgctgattagacaactgattcaaatagaagagcagcaggcgt
tagagcagattcagcaattgaatttattcaggctatccaggcctggttgcaacagtttagaggcacagcacaacactggtta
tggcactgggctcaaatctgtcatcaccggcagaagtttcatcaggctcattttcacaagcactgaatcaagattcaggccaa
ctgagaatttggacaacaggctcaacaggcggcgatgaaggcgatggcggcgccgatggcacaatggtttcagttaattttag
atggcgaatggcattacacaaccggcgatcagtttatgcagttggctcactggcacaactgggctcatggtcaccggcaa
atgcagttagactgacagatgtttcaattatccgacatggaaaggcgcaatttcaactgccggcaggccaagcagttgaatgg
aatgcattgttagatcagaagcagatccgacacaagttagacaatggcaagcaggcgatataatagagttacagcaggcgc
aggcgcaacaacaattggcagactgtaa

```

SEQ ID NO: 6. Proteína madura de amilasa G4 de *Pseudomonas mendocina* (cepa ymp) con M agregado en el extremo N (proteína A4XX23):

```

1   MDAPGKTASG VRYHGGDEII LQGFHWNTVR TSSNWIATLA SMAPTIAADG
51  FSAIWMPVPW RDFSSWSDPG NGTSGGEGEY FWHDFNKNGR YGSDSLLRQA
101 ASALNAAGVK PIYDVVPNHM NRGYPDKEIN LPAGQGLWRH DCNDPGNYAN
151 DCDDGDRFMG GDADLNTGHP QNYAMFRDEF ARLRSQYGAG GFRFDFVIRGY
201 AGERVASWMS DAHDNGFCLG ELWKAPGEYP SWDWRNGASW QQILKDWSDR
251 AKCTVDFDFAI KERMQNGGIA DWRHGLNGNP DARWREVAVT FVDNHDTGYS
301 PGPHGGQHHW PLPDARLKQA YAYILSSPGT PVVYWPAMYD WGHGDFIRQL
351 IQIRRAAGVK AASAIQFHTG FSGLVATISG SQQQLLIALD SNLSSPGQVA
401 SGDFTQALNT DNGAIRIWRG GQGGDGQGN LSVNFRCDN GVTQWGDVY
451 ALGNVTQLGN WSPAGAVRLT DTSAYPTWKG SIALPAGQQV QWKCIVRSES
501 NPTQVKTWQP GGNSVTVAS GASTAGSF*

```

SEQ ID NO: 7. Secuencia de ADN de nucleótido que codifica la amilasa G4 de *Pseudomonas mendocina* (cepa ymp) (A4XX23) con M agregado en el extremo N: (A4XX23 DNA):

atggatgcaccgggcaaaacagcatcagggcgttagatcatcatggcggcgatgaaattattctgcaaggetttcattggaatac  
 agttagaacatcatcaaattggatgcaaacactggcatcaatggcaccgacactggcagcagatggcttttcagcaatttgga  
 tgcgggttccgtggagagatttttcatcatggtcagatccgggcaatggcacatcaggcggcggcgaaggctatttttggcat  
 gattttaataaaaaatggcagataggctcagattcactgctgagacaagcagcatcagcactgaatgcagcaggcgttaaac  
 gatattgatgttgttccgaatcatatgaatagaggctatccggataaagaaataatctgcccggcaggccaaggcctgtgga  
 gacatgattgcaatgatccgggcaattatgcaaatgattgctgatggcagatagatttatggcggcgatgctgatctgaat  
 acaggccatccgcaaaattatgcaatgttagagatgaatttgcaagactgagatcacaatattggcgcaggcggcttagatt  
 tgattttgttagaggctatgcaggcgaaagagtgcacatcatggatgtcagatgcacatgataatggcttttgcctgggccaac  
 tgtggaaagcaccgggccaatccgtcatgggatgggagaaatggcgcacatcatggcaacaaattctgaaagattggctcagat  
 agagcaaaatgcacagtttttgattttgcaactgaaagaaagaaatgcaaaatggcggcatgacagattggagacatggcctgaa  
 tggcaatccggatgcaagatggagagaagttgcagttacatttgttgataatcatgatcacaggctattcacccgggcccgcag  
 gggccaacatcattggcggctgcccggatgcaagactgaaacaagcatatgcatatattctgtcatcaccgggacacccggct  
 gtttattggccgatatgtatgattggggctcatggagatttattagacaactgattcaaatagaagagcagcaggcgttaa  
 agcagcatcagcaattcaatttcatcacaggcttttcaggcctggctgcaacaatttcaggetcacaacaacaactgctgattg  
 cactggattcaaatctgtcatcaccgggccaagttgcatcaggcagttttacacaagcactgaatacagataatggcgaatt  
 agaatttgagatcaggccaaggcggcggcgatggccaaggcaatctggtttcagtttaatttttagatgcatatggcgttac  
 acaatggggcgatcagttttatgcaactggcaatggttacacaactgggcaattggctcaccggcaggcgcagttagactgacag  
 atacatcagcatatccgacatggaaaggctcaattgcaactgcccggcaggccaacaagttcaatggaaatgcatgttagatca  
 gaatcaaatccgacacaagttaaaacatggcaaccgggcccgaataattcagttacagttgcatcaggcgcacacagcagg  
 ctcattttaa

5 SEQ ID NO: 8. Proteína madura de amilasa G4 de *Hahella chejuensis* (cepa KCTC 2396) con M agregado en el extremo N (proteína Q2SEA8):

1	M	E	S	S	G	K	S	G	A	G	V	R	F	H	G	G	D	E	I	I	L	Q	G	F	H	W	N	V	R	T	A	E	R	N	W	Y	N	I	L	Q	S	K	A	Q	Q	I	S	E	D	
51	G	F	T	A	I	W	M	F	V	P	W	R	D	N	S	S	W	Q	A	S	S	D	T	R	F	G	G	E	G	Y	F	W	A	D	M	D	K	N	S	R	Y	G	D	D	G	Q	L	K	Q	A
101	A	S	A	L	K	N	K	G	V	K	V	I	Y	D	I	V	P	N	H	H	D	R	G	H	S	N	D	S	L	N	L	P	S	G	Q	G	Y	Y	R	S	D	C	S	S	C	D	D	G	D	P
151	F	M	D	G	G	S	D	F	S	T	A	H	P	D	V	Y	D	L	F	K	N	E	L	V	N	L	K	T	N	S	A	G	G	F	R	F	D	F	V	R	G	Y	A	P	E	R	I	S	A	
201	W	M	S	A	S	L	D	S	G	Y	C	V	G	E	L	W	K	G	P	S	E	Y	P	S	W	D	W	R	H	S	A	S	W	Q	E	I	L	K	D	F	T	D	A	S	D	C	S	V	F	D
251	F	A	L	K	E	R	M	Q	N	G	S	I	S	D	W	R	Y	G	L	N	G	N	P	S	A	Q	W	R	E	V	A	V	T	F	V	D	N	H	D	T	G	Y	S	P	G	P	L	G	G	Q
301	H	H	W	A	L	P	D	W	K	R	K	M	A	Y	A	Y	I	L	S	S	P	G	T	P	V	V	Y	W	P	H	M	Y	D	W	G	M	R	D	F	I	R	N	L	I	Q	L	R	K	S	A
351	G	V	K	A	Y	S	G	V	Q	F	H	D	G	F	S	G	L	V	G	T	T	S	G	S	N	G	K	L	L	F	A	I	D	S	N	F	S	S	P	N	Q	V	A	G	G	A	W	N	L	A
401	V	N	E	D	N	G	R	I	R	I	W	R	Q	*																																				

SEQ ID NO: 9. Secuencia de ADN de nucleótido que codifica la amilasa G4 de *Hahella chejuensis* (cepa KCTC 2396) con M agregado en el extremo N (ADN de Q2SEA8):

atggaatcatcaggcaaatcaggcgcaggcgttagatttcatggcggcgatgaaattattctgcaaggetttcattggaacgt  
 tgttagaacagcagaaagaaactggtacaacatcctgcaatcaaaagcacaacaatttcagaagatggctttacagcaattt  
 ggatgccggttccgtggagagataattcatcatggcaagcatcatcagatacaagatttgccggcgaaggctatttttgggca  
 gataggataaaattcaagataggcagatggccaactgaaacaagcagcatcagcactgaaaaataaaggcgttaagt  
 tatttatgatattgttccgaatcatcatgatagaggccattcaaatgattcactgaatctgcccgtcaggccaaggctattata  
 gatcagattgctcatcatgcatgatggcagatccggtttatggatggcggctcagatttttcaacagcacaatccggatggttac  
 gatctgtttaaaccgaactggttaacctgaaacaactactcagcaggcggcttagatttgattttgttagaggctatgc  
 accggaaagaatttcagcatggatgtcagcatcactggattcaggctattgcttggcgaactgtgaaaggcccgcagaat  
 atccgtcatgggattggagacattcagcatcatggcaagaaattctgaaagattttacagatgcatcagattgctcagttttt  
 gattttgcaactgaaagaagaatgcaaaatggctcaatttcagattggagataggcctgaatggcaatccgtcagcacaatg  
 gagagaagtgcagttacattttgttgataatcatgatcacaggctatcacccgggcccgcctggcggccaacatcatgggac  
 tggcggattggaaagaaaaatggcatatgcatatattctgtcatcaccgggacacccggtgtgtttatggccgatatgtat  
 gattggggcagatgagagattttattagaatctgatccaactgagaaaatcagcaggcgttaaagcatattcaggcgttcaatt  
 tcatgatggcttttcaggcctggtggcacaacatcaggctcaaatggcaactgctgtttgcaattgatccaatttttcat  
 caccgaatcaagttgcaggcggcgcagatggaatctggcagtttaagaagatattggcagaattagaatttgagacaataa

10

SEQ ID NO: 10. >gi|77787|pir| |S05667 proteína madura glucano 1,4-alfa-maltotetrahidrolasa (EC 3.2.1.60) sin la secuencia señal - Pseudomonas saccharophila

DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVVREAPNDWYNILRQQASTIAADGFSAIWMPVWPWRDFSSWTDGGKSGGGEGYFWHDF  
 NKNGRYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVFNHMMNRGYPDKKEINLPAGQGFWRNDCADPGNYPNDCDDGDRFIGGESDLNTG  
 HPQIYGMFRDELANLRSYGGAGGFRFDFVVRGYAPERVDSWMSDSADSSFCVGELEWKGFPSEYPSWDWRNTASWQQI IKDWS DRA  
 KCPVDFDFALKERMQNGSVADWKHGLNGNPDPRWREVAVTFVDNHD TGYSFGQNGGQHWWALQDGLIRQAYAYILTSPGTPVYV  
 WSHMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSGYSGLVATVSGSQTLVVALNSDLANPGQVASSGFSSEAVNASNGQVRV  
 WRS GSGDGGGNDGGEGGLVNVNFRCDNGVTQMGSVYAVGNVSQLGNWSPASAVRLDTS SYPTWKGSIALPDGQNVKCL I  
 RNEADATLVRQWQSGGNQVQAAAGASTSGSF

SEQ ID NO: 11. Péptido señal de glucano 1,4-alfa-maltotetrahidrolasa (EC 3.2.1.60) - Pseudomonas saccharophila

5 MSHILRAAVLAAVLLPFPALA

SEQ ID NO: 12. Secuencia de proteínas maduras de pMS1776

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QKASTIAADG  
 51 FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEGYFW HDFNKNGLYG SDAQLRQAAG  
 101 ALGGAGVKVL YDVVFNHMMNR FYDPKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC  
 151 DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSYGGAGGF RFDFVVRGYAP  
 201 ERVDSWMSDS ADSSFCVGELEWKGFPSEYPSWDWRNTASWQQI IKDWS DRAK  
 251 CPVDFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDPRWREVAVTFVDNHD TGYSFG  
 301 QNGGQHKWPL PDGLIRQAYAYILTSPGTPV VYWPAMYDWG YGDFIRQLIQ  
 351 VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LDNPGQVASSG  
 401 SFSEAVNASN GQVRVWRS GS GDGGGNDGG\*

SEQ ID NO: 13. Secuencia de proteínas maduras de pMS1934

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QKASTIAADG  
 51 FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEGYFW HDFNKNGLYG SDAQLRQAAG  
 101 ALGGAGVKVL YDVVFNHMMNR FYDPKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC  
 151 DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSYGGAGGF RFDFVVRGYAP  
 201 ERVDSWMSDS ADSSFCVGELEWKGFPSEYPSWDWRNTASWQQI IKDWS DRAK  
 251 CPVDFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDPRWREVAVTFVDNHD TGYSFG  
 301 QNGGQHKWPL PDGLIRQAYAYILTSPGTPV VYWPAMYDWG YGDFIRQLIQ  
 351 VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LDNPGQVASSG  
 401 SFSEAVNASN GQVRVWRS GS GDGGGNDGG\*

10 SEQ ID NO: 14 Secuencia de proteínas maduras de pMS2020

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QKASTIAADG  
 51 FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEGYFW HDFNKNGLYG SDAQLRQAAG  
 101 ALGGAGVKVL YDVVFNHMMNR FYDPKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC  
 151 DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSYGGAGGF RFDFVVRGYAP  
 201 ERVDSWMSDS ADSSFCVGELEWKGFPSEYPSWDWRNTASWQQI IKDWS DRAK  
 251 CPVDFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDPRWREVAVTFVDNHD TGYSFG  
 301 QNGGQHKWPL PDGLIRQAYAYILTSPGTPV VYWPAMYDWG YGDFIRQLIQ  
 351 VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LDNPGQVASSG  
 401 SFSEAVNAEN GQVRVWRS GS GDGGGNDGG\*

SEQ ID NO: 15 Secuencia de proteínas maduras de pMS2022

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QKASTIAADG  
 51 FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEGYFW HDFNKNGLYG SDAQLRQAAG  
 101 ALGGAGVKVL YDVVFNHMMNR FYDPKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC  
 151 DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSYGGAGGF RFDFVVRGYAP  
 201 ERVDLWMSDS ADSSFCVGELEWKGFPSEYPSWDWRNTASWQQI IKDWS DRAK  
 251 CPVDFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDPRWREVAVTFVDNHD TGYSFG  
 301 QNGGQHKWPL PDGLIRQAYAYILTSPGTPV VYWPAMYDWG YGDFIRQLIQ  
 351 VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LDNPGQVASSG  
 401 SFSEAVNAEN GQVRVWRS GS GDGGGNDGG\*

SEQ ID NO: 16 Secuencia de proteínas maduras de pMS2062

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QKASTIAADG  
 51 FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEGYFW HDFNKNGLYG SDAQLRQAAG  
 101 ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC  
 151 DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSGYGAGGF RFDVVRGYAP  
 201 ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKKPSEYPPW DWRNRASWQE IIKDWSDRAK  
 251 CPVDFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDW RWREVAVTFV DNHDTGYSPG  
 301 QNGGQHKWPL PDGLIRQAYA YILTSPTGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ  
 351 VRRTAGVRAD SAISFHSYGS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LDNPGQVASG  
 401 SFSEAVNASN GQVRVWRS GS GDGGGNDGG\*

SEQ ID NO: 17 Secuencia de proteínas maduras de pMS2171

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QKASTIAADG  
 51 FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEGYFW HDFNKNGLYG SDAQLRQAAG  
 101 ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC  
 151 DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSGYGAGGF RFDVVRGYAP  
 201 ERVDLWMSDS ADSSFCVGEL WKAPSEYPPW DWRNRASWQQ IIKDWSDRAK  
 251 CPVDFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDW RWREVAVTFV DNHDTGYSPG  
 301 QNGGQHKWPL PDGLIRQAYA YILTSPTGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ  
 351 VRRTAGVRAD SAISFHSYGS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LDNPGQVASG  
 401 SFSEAVNAEN GQVRVWRS GS GDGGGNDGG\*

5 SEQ ID NO: 18 Secuencia de proteínas maduras de pMS465:

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QQASTIAADG  
 51 FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEGYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG  
 101 ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC  
 151 DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSGYGAGGF RFDVVRGYAP  
 201 ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKSPSEYPPW DWRNTASWQQ IIKDWSDRAK  
 251 CPVDFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDW RWREVAVTFV DNHDTGYSPG  
 301 QNGGQHKWPL QDGLIRQAYA YILTSPTGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ  
 351 VRRTAGVRAD SAISFHSYGS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG  
 401 SFSEAVNASN GQVRVWRS GS GDGGGNDGG\*

SEQ ID NO: 19 Secuencia de proteínas maduras de pMS1042:

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QQASTIAADG  
 51 FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEGYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG  
 101 ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC  
 151 DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSGYGAGGF RFDVVRGYAP  
 201 ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKEPSEYPPW DWRNTASWQQ IIKDWSDRAK  
 251 CPVDFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDW RWREVAVTFV DNHDTGYSPG  
 301 QNGGQHKWPL QDGLIRQAYA YILTSPTGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ  
 351 VRRTAGVRAD SAISFHSYGS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG  
 401 SFSEAVNASN GQVRVWRS GS GDGGGNDGG\*

SEQ ID NO: 20 Secuencia de proteínas maduras de pMS1104:

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QKASTIAADG  
 51 FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEGYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG  
 101 ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC  
 151 DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSGYGAGGF RFDVVRGYAP  
 201 ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKEPSEYPPW DWRNTASWQQ IIKDWSDRAK  
 251 CPVDFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDW RWREVAVTFV DNHDTGYSPG  
 301 QNGGQHKWPL QDGLIRQAYA YILTSPTGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ  
 351 VRRTAGVRAD SAISFHSYGS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG  
 401 SFSEAVNASN GQVRVWRS GS GDGGGNDGG\*

10

SEQ ID NO: 21 Secuencia de proteínas maduras de pMS1153:

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVRE APYNWYNILR QQASTIAADG  
 51 FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEYFW HDFNKNGLYG SDAQLRQAAG  
 101 ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYDPKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC  
 151 DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSYGAGGF RFDVVRGYAP  
 201 ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKEPSEYPPW DWRNTASWQQ I IKDWSDRAK  
 251 CPVDFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPD P RWREVAVTFV DNHDTGYSPG  
 301 QNGGQHKWPL QDGLIRQAYA YILTSFGTPV VYWPAMYDWG YGDFIRQLIQ  
 351 VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG  
 401 SFSEAVNASN GQVRVWRS GS GDGGGNDGG\*

SEQ ID NO: 22 Secuencia de proteínas maduras de pMS1286:

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVRE APYNWYNILR QQASTIAADG  
 51 FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG  
 101 ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYDPKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC  
 151 DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSYGAGGF RFDVVRGYAP  
 201 ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKEPSEYPPW DWRNRASWQQ I IKDWSDRAK  
 251 CPVDFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPD P RWREVAVTFV DNHDTGYSPG  
 301 QNGGQHKWPL QDGLIRQAYA YILTSFGTPV VYWPAMYDWG YGDFIRQLIQ  
 351 VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG  
 401 SFSEAVNASN GQVRVWRS GS GDGGGNDGG\*

5 SEQ ID NO: 23 Secuencia de proteínas maduras de pMS1284:

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVRE APYNWYNILR QQASTIAADG  
 51 FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG  
 101 ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYDPKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC  
 151 DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSYGAGGF RFDVVRGYAP  
 201 ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKEPSEYPPW DWRNRASWQQ I IKDWSDRAK  
 251 CPVDFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPD P RWREVAVTFV DNHDTGYSPG  
 301 QNGGQHKWPL PDGLIRQAYA YILTSFGTPV VYWPAMYDWG YGDFIRQLIQ  
 351 VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG  
 401 SFSEAVNASN GQVRVWRS GS GDGGGNDGG\*

SEQ ID NO: 24 Secuencia de proteínas maduras de pMS1290:

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVRE APYNWYNILR QQASTIAADG  
 51 FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG  
 101 ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYDPKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC  
 151 DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSYGAGGF RFDVVRGYAP  
 201 ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKEPSEYPPW DWRNKASWQQ I IKDWSDRAK  
 251 CPVDFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPD P RWREVAVTFV DNHDTGYSPG  
 301 QNGGQHKWPL QDGLIRQAYA YILTSFGTPV VYWPAMYDWG YGDFIRQLIQ  
 351 VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG  
 401 SFSEAVNASN GQVRVWRS GS GDGGGNDGG\*

SEQ ID NO: 25 Secuencia de proteínas maduras de pMS1484:

10 1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVRE APYNWYNILR QQASTIAADG  
 51 FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG  
 101 ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYDPKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC  
 151 DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSYGAGGF RFDVVRGYAP  
 201 ERVDLWMSDS ADSSFCVGEL WKEPSEYPPW DWRNTASWQQ I IKDWSDRAK  
 251 CPVDFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPD P RWREVAVTFV DNHDTGYSPG  
 301 QNGGQHKWPL QDGLIRQAYA YILTSFGTPV VYWPAMYDWG YGDFIRQLIQ  
 351 VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG  
 401 SFSEAVNASN GQVRVWRS GS GDGGGNDGG\*



## SEQ ID NO: 26 Secuencia de proteínas maduras de pMS1579:

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVRE APYNWYNILR QQASTIAADG  
 51 FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG  
 101 ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPND  
 151 DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSYGAGGF RFDVVRGYAP  
 201 ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKEPSEYPPW DWRNTASWQQ IIKDWSDRAK  
 251 CPVDFDHALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDW RWREVAVTFV DNHDTGYSFG  
 301 QNGGQHKWPL QDGLIRQAYA YILTSFGTPV VYWPAMYDWG YGDFIRQLIQ  
 351 VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG  
 401 SFSEAVNAEN GQVRVWRSQS GDGGGNDGG\*

## SEQ ID NO: 27 Secuencia de proteínas maduras de pMS1105:

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVRE APYNWYNILR QKASTIAADG  
 51 FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG  
 101 ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPND  
 151 DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSYGAGGF RFDVVRGYAP  
 201 ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKSPSEYPPW DWRNTASWQQ IIKDWSDRAK  
 251 CPVDFDHALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDW RWREVAVTFV DNHDTGYSFG  
 301 QNGGQHKWPL QDGLIRQAYA YILTSFGTPV VYWPAMYDWG YGDFIRQLIQ  
 351 VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG  
 401 SFSEAVNASN GQVRVWRSQS GDGGGNDGG\*

## 5 SEQ ID NO: 28 Secuencia de proteínas maduras de pMS1723:

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVRE APYNWYNILR QKASTIAADG  
 51 FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG  
 101 ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPND  
 151 DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSYGAGGF RFDVVRGYAP  
 201 ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKSPSEYPPW DWRNTASWQQ IIKDWSDRAK  
 251 CPVDFDHALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDW RWREVAVTFV DNHDTGYSFG  
 301 QNGGQHKWPL QDGLIRQAYA YILTSFGTPV VYWPAMYDWG YGDFIRQLIQ  
 351 VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LDNPGQVASG  
 401 SFSEAVNASN GQVRVWRSQS GDGGGNDGG\*

## SEQ ID NO: 29 Secuencia de proteínas maduras de pMS2104:

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVRE APYNWYNILR QKASTIAADG  
 51 FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEYFW HDFNKNGLYG SDAQLRQAAG  
 101 ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPND  
 151 DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSYGAGGF RFDVVRGYAP  
 201 ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKAPSEYPPW DWRNRASWQQ IIKDWSDRAK  
 251 CPVDFDHALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDW RWREVAVTFV DNHDTGYSFG  
 301 QNGGQHKWPL PDGLIRQAYA YILTSFGTPV VYWPAMYDWG YGDFIRQLIQ  
 351 VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LDNPGQVASG  
 401 SFSEAVNASN GQVRVWRSQS GDGGGNDGG\*

## SEQ ID NO: 30 Secuencia de proteínas maduras de pMS2138:

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVRE APYNWYNILR QKASTIAADG  
 51 FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEYFW HDFNKNGLYG SDAQLRQAAG  
 101 ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPND  
 151 DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSYGAGGF RFDVVRGYAP  
 201 ERVDLWMSDS ADSSFCVGEL WKSPSEYPPW DWRNRASWQQ IIKDWSDRAK  
 251 CPVDFDHALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDW RWREVAVTFV DNHDTGYSFG  
 301 QNGGQHKWPL PDGLIRQAYA YILTSFGTPV VYWPAMYDWG YGDFIRQLIQ  
 351 VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LDNPGQVASG  
 401 SFSEAVNASN GQVRVWRSQS GDGGGNDGG\*

SEQ ID NO: 31 Secuencia de proteínas maduras de pMS2124:

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVRE APYNWYNILR QKASTIAADG  
 51 FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEYFW HDFNKNGLYG SDAQLRQAAG  
 101 ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPND  
 151 DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSYGAGGF RFDVVRGYAP  
 201 ERVDLWMSDS ADSSFCVGEL WKKPSEYPPW DWRNRASWQE IIKDWSRAK  
 251 CPVDFDFAKE RMQNGSVADW KHGLNGNDP RWREVAVTFV DNHDTGYSFG  
 301 QNGGQHKWPL PDGLIRQAYA YILTSFGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ  
 351 VRRTAGVRAD SAISFHSYGS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LDNPGQVASG  
 401 SFSEAVNAEN GQVRVWRSGS GDGGGNDGG\*

SEQ ID NO: 32 Secuencia de proteínas maduras de pMS2177:

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVRE APYQWYNILR QKASTIAADG  
 51 FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEYFW HDFNKNGLYG SDAQLRQAAG  
 101 ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPND  
 151 DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSYGAGGF RFDVVRGYAP  
 201 ERVDLWMSDS ADSSFCVGEL WKKPSEYPPW DWRNRASWQE IIKDWSRAK  
 251 CPVDFDFAKE RMQNGSVADW KHGLNGNDP RWREVAVTFV DNHDTGYSFG  
 301 QNGGQHKWPL PDGLIRQAYA YILTSFGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ  
 351 VRRTAGVRAD SAISFHSYGS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LDNPGQVASG  
 401 SFSEAVNAEN GQVRVWRSGS GDGGGNDGG\*

5 SEQ ID NO: 33 Secuencia de proteínas maduras de pMS2178:

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVRE APYNWYNILR QKASTIAADG  
 51 FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEYFW HDFNKNGLYG SDAQLRQAAG  
 101 ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPND  
 151 DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSYGAGGF RFDVVRGYAP  
 201 ERVDLWMSDS ADSSFCVGEL WKKPSEYPPW DWRNRASWQE IIKDWSRAK  
 251 CPVDFDFAKE RMQNGSVADW KHGLNGNDP RWREVAVTFV DNHDTGYSFG  
 301 QNGGQHKWPL PDGLIRQAYA YILTSFGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ  
 351 VRRTAGVRAD SAISFHSYGS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LDNPGQVASG  
 401 SFSEAVNAEN GQVRVWRSGS GDGGGNDGG\*

SEQ ID NO: 34 Secuencia de proteínas maduras de pMS2118:

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVRE APYNWYNILR QKASTIAADG  
 51 FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEYFW HDFNKNGLYG SDAQLRQAAG  
 101 ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPND  
 151 DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSYGAGGF RFDVVRGYAP  
 201 ERVDLWMSDS ADSSFCVGEL WKSPSEYPPW DWRNRASWQE IIKDWSRAK  
 251 CPVDFDFAKE RMQNGSVADW KHGLNGNDP RWREVAVTFV DNHDTGYSFG  
 301 QNGGQHKWPL PDGLIRQAYA YILTSFGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ  
 351 VRRTAGVRAD SAISFHSYGS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LDNPGQVASG  
 401 SFSEAVNAEN GQVRVWRSGS GDGGGNDGG\*

SEQ ID NO: 35. Secuencia Enlazadora

10 GSGDGGGNDGG

SEQ ID NO: 36: Secuencia de PS4 SBD:

1 EGGLVNVNFR CDNGVTQMGD SVYAVGNVSQ LGNWSPASAV RLTDTSYPT  
 51 WKGSIALPDG QNVEWKCLIR NEADATLVRQ WQSGGNNQVQ AAAGASTSGS  
 101 F\*

SEQ ID NO: 37

HGGDEIILQFHWN

15 SEQ ID NO: 38

DGF-X1-AIW-X2-P-X3-PWRD-X4-SSW

SEQ ID NO: 39

GGEGYFW

SEQ ID NO: 40

VPNH

SEQ ID NO: 41

CDDGD

5 SEQ ID NO: 42

AGGFRFDFVRG

SEQ ID NO: 43

FALK

SEQ ID NO: 44

10 WREVAVTFVDNHD

SEQ ID NO: 45

GYSPG

SEQ ID NO: 46

GQH

15 SEQ ID NO: 47

AYAYI

SEQ ID NO: 48

SPGTP

SEQ ID NO: 49

20 VYW

SEQ ID NO: 50

HMYDWG

SEQ ID NO: 51: Novamyl:

SSSASVKGDVIYQIIIDRFYDGDTTNNNPAKSYGLYDPTKSKWKMYWGGDLEGVRQKLPYLKQLGVTTIWLSPVLDNLDTLAG  
TDNTGYHGYWTRDFKQIEEHFGNWTTFDTLVNDAHQNGIKVIVDFVFNHSTPFKANDSTFAEGGALYNNGTYMGNYFDDATKG  
YFHHNGDISNWDDRYEAQWKNFTDPAGFSLADLSQENGTIAQYLTDAAVQLVAHGADGLRIDAVKHFNSGFSKSLADKLYQKK  
DIFLVGEWYGDDPGTANHLEKVRVYANNSGVNVLDFDLNVTIRNVFGTFTQTMYDLNMMVNQTGNEYKYKENLITFIDNHMSR  
FLSVNSNKANLHQALAFILTSRGTPSIYYGTEQYMAGGNDPYNRGMMPAFDTTTTAFKEVSTLAGLRRNNAAIQYGTTRQWI  
NNDVYIYERKFFNDVVLVAINRNTQSSYSISGLQTALPNGSYADYLSGLLGGNGISVSNGSVASFTLAPGAVSVWQYSTSASA  
PQIGSVAPNMGIPGNVVTIDGKGFQTTQGTVTFGGVTATVKSWTSNRIEVYVPNMAAGLTDVKVTAGGVSSNLYSYNILSGTQ  
TSVVFTVKSAPPINLGDKIYLTGNIPELGNWSDTSGAVNNAQGPLLAPNYPDWFYVFSVPAGKTIQFKFFIKRADGTIQWEN  
GSNHVATTPTGATGNIIVTWQN

25

# ES 2 604 666 T3

## SEQ ID NO: 52: Secuencia de nucleótidos de pMS382:

```
1 gatcaagcag gaaaaagccc ggcaggcgtc agatcatcag gcggcgatga aatcatcctt
61 cagggctttc attggaacgt cgtcagagaa gcgccgtata actggtataa catcctgaga
121 caacaagcga gcacaattgc cgtgatggc tttccgcaa tctggatgcc ggtccgtgg
181 agagatttta gcagctggac ggatggagat aaaagcggag gcggcgaagg atatTTTTGG
241 catgacttta acaaaaacgg ccgctatgga agcgatgctc aactgagaca agcagcagga
301 gcacttggag gagcaggagt caaagtctg tacgatgctg tcccgaacca tatgaaccgc
361 ttttatccgg acaagaaat caatctgccg gcaggccaaa gattttggag aaacgattgc
421 cgggaccgg gaaatggacc gaatgattgc gatgatggcg atagatttct gggcggcgaa
481 gcggatctga atacaggcca tccgcaaatc tatggcatgt ttcgggacga atttacgaat
541 ctgagaagcg gatatggagc gggcggattt cgctttgatt ttgtcagagg ctatgccccg
601 gaaagagttg atagctggat gagcgttca gcggatagca gcttttgcgt cggcgaactt
661 tggaaagaac cgagcgaata tccgccgtgg gattggagaa atacagcagag ctggcagcag
721 atcatcaaag attggagcga tagagcaaaa tgcccgtct ttgactttgc cctgaaagaa
781 cgcattgcaa atggaagcgt cgccgattgg aaacatggcc tgaacggaaa tccggaccgc
841 agatggagag aagtgcgccg cactttgtc gataacccatg acacaggata tagcccgga
901 caaaatggag gacaacataa atggccgctt caagatggcc ttatcagaca ggcgatgccc
961 tatatcctta catcaccggg aacaccggtt gtttattggc cgcataatgta tgattggggc
1021 tatggcgatt tcatccgcca actgatccag gttagaagaa cagcaggagt cagagcggat

1081 agcgccatta gctttcatag cggctatagc ggacttgtcg ctacagttag cggcagccaa
1141 caaacactgg tcgtgccect gaatagcgat ctggcaaatc cgggacaagt tgctagcggc
1201 agctttagcg aagcagtcaa tgccagcaat ggccaagtca gagtctggag aagcgggaagc
1261 ggagatggag gaggaaatga cggaggataa
```

Nota: El extremo N derivado de esta secuencia de nucleótidos es DQA... Sin embargo, el constructo final se puede extender en el extremo 5 con atg pra codificar M en el extremo N.

5

### Listado de secuencias

<110> Danisco A/S

<120> Polipéptidos de amilasa

<130> 17540PCT00

10 <160> 72

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 429

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS382

<400> 1

ES 2 604 666 T3

Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp  
 1 5 10 15  
 Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro  
 20 25 30  
 Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Gln Ala Ser Thr Ile Ala Ala  
 35 40 45  
 Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser  
 50 55 60  
 Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp  
 65 70 75 80  
 His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Arg Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg  
 85 90 95  
 Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp  
 100 105 110  
 Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn  
 115 120 125  
 Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly  
 130 135 140  
 Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu  
 145 150 155 160  
 Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp

ES 2 604 666 T3

				165						170										175
Glu	Phe	Thr	Asn	Leu	Arg	Ser	Gly	Tyr	Gly	Ala	Gly	Gly	Phe	Arg	Phe					
			180					185					190							
Asp	Phe	Val	Arg	Gly	Tyr	Ala	Pro	Glu	Arg	Val	Asp	Ser	Trp	Met	Ser					
		195					200					205								
Asp	Ser	Ala	Asp	Ser	Ser	Phe	Cys	Val	Gly	Glu	Leu	Trp	Lys	Glu	Pro					
	210					215					220									
Ser	Glu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Trp	Arg	Asn	Thr	Ala	Ser	Trp	Gln	Gln					
225					230					235					240					
Ile	Ile	Lys	Asp	Trp	Ser	Asp	Arg	Ala	Lys	Cys	Pro	Val	Phe	Asp	Phe					
			245						250					255						
Ala	Leu	Lys	Glu	Arg	Met	Gln	Asn	Gly	Ser	Val	Ala	Asp	Trp	Lys	His					
			260					265					270							
Gly	Leu	Asn	Gly	Asn	Pro	Asp	Pro	Arg	Trp	Arg	Glu	Val	Ala	Val	Thr					
		275					280					285								
Phe	Val	Asp	Asn	His	Asp	Thr	Gly	Tyr	Ser	Pro	Gly	Gln	Asn	Gly	Gly					
	290					295					300									
Gln	His	Lys	Trp	Pro	Leu	Gln	Asp	Gly	Leu	Ile	Arg	Gln	Ala	Tyr	Ala					
305					310					315					320					
Tyr	Ile	Leu	Thr	Ser	Pro	Gly	Thr	Pro	Val	Val	Tyr	Trp	Pro	His	Met					
				325					330					335						
Tyr	Asp	Trp	Gly	Tyr	Gly	Asp	Phe	Ile	Arg	Gln	Leu	Ile	Gln	Val	Arg					
			340					345					350							
Arg	Thr	Ala	Gly	Val	Arg	Ala	Asp	Ser	Ala	Ile	Ser	Phe	His	Ser	Gly					
		355					360					365								
Tyr	Ser	Gly	Leu	Val	Ala	Thr	Val	Ser	Gly	Ser	Gln	Gln	Thr	Leu	Val					
	370					375					380									
Val	Ala	Leu	Asn	Ser	Asp	Leu	Ala	Asn	Pro	Gly	Gln	Val	Ala	Ser	Gly					
385					390					395					400					
Ser	Phe	Ser	Glu	Ala	Val	Asn	Ala	Ser	Asn	Gly	Gln	Val	Arg	Val	Trp					
				405					410					415						

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly  
 420 425

<210> 2  
 <211> 531  
 <212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína madura de amilasa G4 de Pseudomonas sp. AM1 (2006) con M agregado en el extremo N (proteína Q1EJP2)

<400> 2

Met Asp Leu Ala Gly Lys Ser Pro Gly Gly Val Arg Tyr His Gly Gly  
 1 5 10 15

Asp Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Ile Arg Glu Ser  
 20 25 30

Pro Asn Asn Trp Tyr Asn Thr Leu Arg Asp Met Ala Pro Thr Ile Ala  
 35 40 45

Ala Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe  
 50 55 60

Ser Ser Trp Ser Asp Gly Ala Asn Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe  
 65 70 75 80

Trp His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Arg Tyr Gly Ser Asp Thr Gln Leu  
 85 90 95

Lys Gln Ala Ala Gly Ala Leu Asn Asn Ala Gln Val Lys Val Leu Tyr  
 100 105 110

Asp Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Gly Tyr Pro Asp Lys Gln Ile  
 115 120 125

Asn Leu Pro Ala Gly Gln Gly Phe Trp Arg Asn Asp Cys Ala Asp Pro  
 130 135 140

Gly Asn Tyr Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Met Gly Gly  
 145 150 155 160

Asp Ala Asp Leu Asn Thr Ala Asn Pro Gln Val Tyr Gly Met Phe Arg  
 165 170 175

Asp Glu Phe Ala Asn Leu Arg Ser Asn Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg  
 180 185 190

10

ES 2 604 666 T3

Phe Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Gly Glu Arg Val Asp Ser Trp Met  
 195 200 205  
  
 Gly Ala Ala His Asp Asn Ala Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Ala  
 210 215 220  
  
 Pro Ala Glu Tyr Pro Ser Trp Asp Trp Arg Asn Thr Ala Ser Trp Gln  
 225 230 235 240  
  
 Gln Val Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp  
 245 250 255  
  
 Phe Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Ile Ala Asp Trp Lys  
 260 265 270  
  
 Asn Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val  
 275 280 285  
  
 Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ala Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly  
 290 295 300  
  
 Gly Gln His His Trp Ala Leu Gln Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr  
 305 310 315 320  
  
 Ala Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Ser His  
 325 330 335  
  
 Met Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val  
 340 345 350  
  
 Arg Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser  
 355 360 365  
  
 Gly Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu  
 370 375 380  
  
 Val Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Ala Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser  
 385 390 395 400  
  
 Gly Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val  
 405 410 415  
  
 Trp Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly Glu Gly  
 420 425 430  
  
 Gly Leu Val Asn Val Asn Phe Arg Cys Asp Asn Gly Val Thr Gln Met  
 435 440 445



ES 2 604 666 T3

Gly Asp Ser Val Tyr Ala Val Gly Asn Val Ser Gln Leu Gly Asn Trp  
 450 455 460

Ser Pro Ala Ser Ala Val Arg Leu Thr Asp Thr Ser Ser Tyr Pro Thr  
 465 470 475 480

Trp Lys Gly Ser Ile Ala Leu Pro Asp Gly Gln Asn Val Glu Trp Lys  
 485 490 495

Cys Leu Ile Arg Asn Glu Ala Asp Ala Thr Leu Val Arg Gln Trp Gln  
 500 505 510

Ser Gly Gly Asn Asn Gln Val Gln Ala Ala Ala Gly Ala Ser Thr Ser  
 515 520 525

Gly Ser Phe  
 530

<210> 3

<211> 1596

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN de nucleótido que codifica la amilasa G4 de Pseudomonas sp. AM1 (2006) (Q1EJP2) con M agregado en el extremo N (ADN de Q1EJP2):

<400> 3

atggatctgg caggcaaatc accgggcggc gttagatatac atggcggcga tgaaattatt 60

ctgcaaggct ttcattggaa tgttattaga gaatcaccga ataattggta taatacactg 120

agagatatgg caccgacaat tgcagcagat ggcttttcag caatttggat gccggttccg 180

tggagagatt tttcatcatg gtcagatggc gcaaattcag gcggcggcga aggctatatt 240

tggcatgatt ttaataaaaa tggcagatat ggctcagata cacaactgaa acaagcagca 300

ggcgcactga ataatgcaca agttaaagtt ctgtatgatg ttgttccgaa tcatatgaat 360

agaggctatc cggataaaca aattaatctg ccggcaggcc aaggcttttg gagaaatgat 420

tgcgcagatc cgggcaatta tccgaatgat tgcgatgatg gcgatagatt tatgggcggc 480

gatgctgatc tgaatacagc aatccgcaa gtttatggca tgtttagaga tgaatttgca 540

aatctgagat caaattatgg cgcaggcggc tttagatttg attttgttag aggctatgca 600

ggcgaaagag ttgattcatg gatgggcgca gcacatgata atgcattttg cgttggcgaa 660

ctgtggaaag caccggcaga atatccgtca tgggattgga gaaatacagc atcatggcaa 720

caagttatta aagattggtc agatagagca aaatgcccg tttttgattt tgcactgaaa 780

10 gaaagaatgc aaaatggctc aattgcagat tggaaaaatg gcctgaatgg caatccggat 840

ES 2 604 666 T3

ccgagatgga gagaagttgc agttacattt gttgataatc atgatgcagg ctattcaccg 900  
 ggccaaaatg ggggccaaca tcattgggca ctgcaagatg gcctgattag acaagcatat 960  
 gcatatattc tgacatcacc gggcacaccg gttgtttatt ggtcacatat gtatgattgg 1020  
 ggctatggcg attttattag acaactgatt caagttagaa gaacagcagg cgttagagca 1080  
 gattcagcaa tttcatttca ttcaggctat tcaggcctgg ttgcaacagt ttcaggctca 1140  
 caacaaacac tggttgttgc actgaatagc gatctggcaa atccgggcca agttgcatca 1200  
 ggctcatttt cagaagcagt taatgcatca aatggccaag ttagagtttg gagatcaggc 1260  
 tcaggcgatg ggggcccga tgatggcggc gaagggcggc tggttaatgt taattttaga 1320  
 tgcgataatg gcgttacaca aatgggcatc tcagtttatg cagttggcaa tgtttcacia 1380  
 ctgggcaatt ggtcaccggc atcagcagtt agactgacag atacatcatc atatccgaca 1440  
 tggaaaggct caattgcact gccggatggc caaaatggtg aatggaaatg cctgattaga 1500  
 aatgaagcag atgcaacact ggttagacaa tggcaatcag gcggcaataa tcaagttcaa 1560  
 gcagcagcag gcgcatcaac atcaggctca ttttaa 1596

<210> 4

<211> 534

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína madura de amilasa G4 de Pseudomonas sp. 7193 con M agregado en el extremo N (proteína A5CVD5)

<400> 4

Met Asp Leu Ala Gly Lys Ser Pro Gly Gly Val Arg Tyr His Gly Gly  
 1 5 10 15

Asp Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Ile Arg Glu Ser  
 20 25 30

Pro Asn Asn Trp Tyr Asn Thr Leu Arg Asp Met Ala Pro Thr Ile Ala  
 35 40 45

Ala Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe  
 50 55 60

Ser Ser Trp Ser Asp Gly Ala Asn Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe  
 65 70 75 80

Trp His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Arg Tyr Gly Ser Asp Thr Gln Leu  
 85 90 95

10 Lys Gln Ala Ala Gly Ala Leu Asn Asn Ala Gln Val Lys Val Leu Tyr

ES 2 604 666 T3

	100		105		110														
Asp	Ala	Val	Pro	Asn	His	Met	Asn	Arg	Gly	Tyr	Pro	Asp	Lys	Gln	Ile				
	115						120					125							
Asn	Leu	Pro	Ala	Gly	Gln	Gly	Phe	Trp	Arg	Asn	Asp	Cys	Ala	Asp	Pro				
	130					135					140								
Gly	Asn	Tyr	Pro	Asn	Asp	Cys	Asp	Asp	Gly	Asp	Arg	Phe	Met	Gly	Gly				
145					150					155					160				
Asp	Ala	Asp	Leu	Asn	Thr	Ala	Asn	Pro	Gln	Val	Tyr	Gly	Met	Phe	Arg				
				165					170					175					
Asp	Glu	Phe	Ala	Asn	Leu	Arg	Ser	Asn	Tyr	Gly	Ala	Gly	Gly	Phe	Arg				
			180					185					190						
Phe	Asp	Phe	Val	Arg	Gly	Tyr	Ala	Gly	Glu	Arg	Val	Asp	Ser	Trp	Met				
	195						200					205							
Gly	Asp	Gly	Ala	Cys	Gln	Arg	Leu	Leu	Arg	Gly	Arg	Ala	Leu	Glu	Gly				
	210					215					220								
Thr	Gly	Arg	Ile	Pro	Glu	Leu	Gly	Leu	Ala	Gln	Tyr	Gly	Gln	Leu	Ala				
225					230					235					240				
Ala	Val	Ile	Lys	Asp	Trp	Ser	Asp	Arg	Ala	Lys	Val	Pro	Gly	Cys	Ser				
				245					250					255					
Asn	Phe	Ala	Leu	Lys	Gly	Ala	His	Ala	Glu	Arg	Leu	Pro	Ser	Pro	Thr				
			260					265					270						
Gly	Arg	Thr	Ala	Ser	Thr	Ala	Thr	Pro	Met	Pro	Arg	Trp	Arg	Glu	Val				
		275					280					285							
Ala	Val	Thr	Phe	Val	Asp	Asn	His	Asp	Thr	Gly	Tyr	Ser	Pro	Gly	Gln				
	290					295					300								
Asn	Gly	Gly	Gln	His	His	Trp	Ala	Leu	Arg	Asp	Asp	Leu	Val	Arg	Gln				
305					310					315					320				
Ala	Tyr	Ala	Tyr	Ile	Leu	Ala	Ser	Pro	Gly	Thr	Pro	Val	Val	Tyr	Trp				
				325					330					335					
Ser	His	Met	Tyr	Asp	Trp	Gly	His	Gly	Pro	Leu	Ile	Arg	Gln	Leu	Ile				
			340					345					350						

ES 2 604 666 T3

Gln Ile Arg Arg Ala Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Glu Phe  
355 360 365

His Ser Gly Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Arg Gly Thr Ala Gln  
370 375 380

Thr Leu Val Met Ala Leu Gly Ser Asn Leu Ser Ser Pro Ala Glu Val  
385 390 395 400

Ser Ser Gly Ser Phe Ser Gln Ala Leu Asn Gln Asp Ser Gly Gln Leu  
405 410 415

Arg Ile Trp Thr Thr Gly Ser Thr Gly Gly Asp Glu Gly Asp Gly Gly  
420 425 430

Gly Asp Gly Thr Met Val Ser Val Asn Phe Arg Cys Asp Asn Gly Ile  
435 440 445

Thr Gln Pro Gly Asp Ser Val Tyr Ala Val Gly Ser Leu Ala Gln Leu  
450 455 460

Gly Ser Trp Ser Pro Ala Asn Ala Val Arg Leu Thr Asp Val Ser Asn  
465 470 475 480

Tyr Pro Thr Trp Lys Gly Ala Ile Ser Leu Pro Ala Gly Gln Ala Val  
485 490 495

Glu Trp Lys Cys Ile Val Arg Ser Glu Ala Asp Pro Thr Gln Val Arg  
500 505 510

Gln Trp Gln Ala Gly Asp Asn Asn Arg Val Thr Ala Gly Ala Gly Ala  
515 520 525

Thr Thr Ile Gly Arg Leu  
530

<210> 5

<211> 1605

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN de nucleótido que codifica la amilasa G4 de Pseudomonas sp. 7193 (A5CVD5) con M agregado en el extremo N (ADN de A5CVD5)

<400> 5

atggatctgg caggcaaatc accgggcggc gttagatatc atggcggcga tgaattatt 60

ctgcaaggct ttcattggaa tgttattaga gaatcaccga ataattggta taatacactg 120

10 agagatatgg caccgacaat tgcagcagat ggcttttcag caatttggat gccggttccg 180

ES 2 604 666 T3

tggagagatt tttcatcatg gtcagatggc gcaaattcag gcggcggcga aggctatfff 240  
 tggcatgatt ttaataaaaa tggcagatat ggctcagata cacaactgaa acaagcagca 300  
 ggcgcactga ataatgcaca agttaagtt ctgtatgatg cagttccgaa tcatatgaat 360  
 agaggctatc cggataaaca aattaatctg ccggcaggcc aaggcttttg gagaaatgat 420  
 tgcgcagatc cgggcaatta tccgaatgat tgcgatgatg gcgatagatt tatgggcggc 480  
 gatgctgatc tgaatacagc aaatccgcaa gtttatggca tgtttagaga tgaatttgca 540  
 aatctgagat caaattatgg cgcagggcggc tttagatttg attttgttag aggctatgca 600  
 ggcgaaagag ttgattcatg gatgggcgat ggcgcagcc aaagactgct gagaggcaga 660  
 gcactggaag gcacaggcag aattccggaa ctgggcctgg cacaatatgg ccaactggca 720  
 gcagttatta aagattggtc agatagagca aaagttccgg gctgctcaa ttttgactg 780  
 aaaggcgcac atgcagaaag actgccgtca ccgacaggca gaacagcatc aacagcaaca 840  
 ccgatgccga gatggagaga agttgcagtt acatttgttg ataatcatga tacaggctat 900  
 tcaccgggcc aaaatggcgg ccaacatcat tgggcactga gagatgatct ggtagacaa 960  
 gcatatgcat atattctggc atcaccgggc acaccggttg tttattggtc acatatgtat 1020  
 gattggggtc atggaccgct gattagacaa ctgattcaa ttagaagagc agcaggcggt 1080  
 agagcagatt cagcaattga atttcattca ggctattcag gcctggttgc aacagttaga 1140  
 ggcacagcac aaacactggt tatggcactg ggctcaaate tgtcatcacc ggcagaagtt 1200  
 tcatcaggct cttttcaca agcactgaat caagattcag gccaaactgag aatttgaca 1260  
 acaggctcaa caggcggcga tgaaggcgat ggcggcggcg atggcacaat ggtttcagtt 1320  
 aattttagat gcgataatgg cattacacaa ccgggcgatt cagtttatgc agttggctca 1380  
 ctggcacaac tgggctcatg gtcaccggca aatgcagtta gactgacaga tgtttcaaat 1440  
 tatccgacat ggaaaggcgc aatttactg ccggcaggcc aagcagttga atggaaatgc 1500  
 attgtagat cagaagcaga tccgacacaa gttagacaat ggcaagcagg cgataataat 1560  
 agagttacag caggcgcagg cgcaacaaca attggcagac tgtaa 1605

<210> 6

<211> 528

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína madura de amilasa G4 de Pseudomonas mendocina (CEPA ymp) con M agregado en el extremo N (proteína A4XX23)

<400> 6

Met Asp Ala Pro Gly Lys Thr Ala Ser Gly Val Arg Tyr His Gly Gly

10 1

5

10

15

ES 2 604 666 T3

Asp Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Thr Val Arg Thr Ser  
 20 25 30  
 Ser Asn Trp Tyr Ala Thr Leu Ala Ser Met Ala Pro Thr Leu Ala Ala  
 35 40 45  
 Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser  
 50 55 60  
 Ser Trp Ser Asp Pro Gly Asn Gly Thr Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr  
 65 70 75 80  
 Phe Trp His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Arg Tyr Gly Ser Asp Ser Leu  
 85 90 95  
 Leu Arg Gln Ala Ala Ser Ala Leu Asn Ala Ala Gly Val Lys Pro Ile  
 100 105 110  
 Tyr Asp Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Gly Tyr Pro Asp Lys Glu  
 115 120 125  
 Ile Asn Leu Pro Ala Gly Gln Gly Leu Trp Arg His Asp Cys Asn Asp  
 130 135 140  
 Pro Gly Asn Tyr Ala Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Met Gly  
 145 150 155 160  
 Gly Asp Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Asn Tyr Ala Met Phe  
 165 170 175  
 Arg Asp Glu Phe Ala Arg Leu Arg Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Gly Phe  
 180 185 190  
 Arg Phe Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Gly Glu Arg Val Ala Ser Trp  
 195 200 205  
 Met Ser Asp Ala His Asp Asn Gly Phe Cys Leu Gly Glu Leu Trp Lys  
 210 215 220  
 Ala Pro Gly Glu Tyr Pro Ser Trp Asp Trp Arg Asn Gly Ala Ser Trp  
 225 230 235 240  
 Gln Gln Ile Leu Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Thr Val Phe  
 245 250 255  
 Asp Phe Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Gly Ile Ala Asp Trp



ES 2 604 666 T3

<210> 7  
 <211> 1587  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Secuencia de ADN de nucleótido que codifica la amilasa G4 de Pseudomonas mendocina (cepa ymp) (A4XX23) con M agregado en el extremo N: (ADN A4XX23)

<400> 7

```

atggatgcac cgggcaaaac agcatcaggc gttagatatac atggcggcga tgaattatt      60
ctgcaaggct ttcattggaa tacagttaga acatcatcaa attggtatgc aacctggca      120
tcaatggcac cgacctggc agcagatggc ttttcagcaa tttggatgcc ggttccgtgg      180
agagattttt catcatggtc agatccgggc aatggcacat caggcggcgg cgaaggctat      240
ttttggcatg attttaataa aatggcaga tatggctcag attcactgct gagacaagca      300
gcatcagcac tgaatgcagc aggcgttaa ccgatttatg atgttgttcc gaatcatatg      360
aatagaggct atccggataa agaaattaat ctgccggcag gccaaaggcct gtggagacat      420
gattgcaatg atccgggcaa ttatgcaaat gattgcatg atggcgatag atttatgggc      480
ggcgatgctg atctgaatac aggcatccg caaaattatg caatgtttag agatgaattt      540
gcaagactga gatcacaata tggcgcaggc ggcttttagat ttgattttgt tagaggctat      600
gcaggcgaaa gagttgcatc atggatgtca gatgcacatg ataatggctt ttgcctgggc      660
gaactgtgga aagcaccggg cgaatatccg tcatgggatt ggagaaatgg cgcacatgg      720
caacaaattc tgaagattg gtcagataga gcaaaatgca cagtttttga ttttgcactg      780
aaagaaagaa tgcaaaatgg cggcattgca gattggagac atggcctgaa tggcaatccg      840
gatgcaagat ggagagaagt tgcagttaca tttgttgata atcatgatac aggctattca      900
ccgggcccgc atggcggcca acatcattgg ccgctgccgg atgcaagact gaaacaagca      960
tatgcatata ttctgtcatc accgggcaca ccggttgttt attggccgca tatgtatgat     1020
tggggtcatg gagattttat tagacaactg attcaaatta gaagagcagc aggcgttaa     1080
gcagcatcag caattcaatt tcatacaggc ttttcaggcc tggttgcaac aatttcaggc     1140
tcacaacaac aactgctgat tgcaactggat tcaaactctgt catcaccggg ccaagttgca     1200
tcaggcgatt ttacacaagc actgaataca gataatggcg caattagaat ttggagatca     1260
ggccaaggcg gcggcgatgg ccaaggcaat ctggtttcag ttaattttag atgcgataat     1320
ggcgttacac aatggggcga ttcagtttat gcaactgggca atgttacaca actgggcaat     1380
tggtcaccgg caggcgcagt tagactgaca gatacatcag catatccgac atggaaaggc     1440
tcaattgcac tgccggcagg ccaacaagtt caatggaaat gcattgtag atcagaatca     1500
aatccgacac aagttaaaac atggcaaccg gcgggcaata attcagttac agttgcatca     1560
ggcgcatcaa cagcaggctc attttaa                                     1587
    
```

10



ES 2 604 666 T3

<210> 8  
 <211> 413  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Proteína madura de amilasa G4 de *Hahella chejuensis* (cepa KCTC 2396) con M agregado en el extremo N (proteína Q2SEA8)

<400> 8

Met Glu Ser Ser Gly Lys Ser Gly Ala Gly Val Arg Phe His Gly Gly  
 1 5 10 15

Asp Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Thr Ala  
 20 25 30

Glu Arg Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Gln Ser Lys Ala Gln Gln Ile Ser  
 35 40 45

Glu Asp Gly Phe Thr Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Asn  
 50 55 60

Ser Ser Trp Gln Ala Ser Ser Asp Thr Arg Phe Gly Gly Glu Gly Tyr  
 65 70 75 80

Phe Trp Ala Asp Met Asp Lys Asn Ser Arg Tyr Gly Asp Asp Gly Gln  
 85 90 95

Leu Lys Gln Ala Ala Ser Ala Leu Lys Asn Lys Gly Val Lys Val Ile  
 100 105 110

Tyr Asp Ile Val Pro Asn His His Asp Arg Gly His Ser Asn Asp Ser  
 115 120 125

Leu Asn Leu Pro Ser Gly Gln Gly Tyr Tyr Arg Ser Asp Cys Ser Ser  
 130 135 140

Cys Asp Asp Gly Asp Pro Phe Met Asp Gly Gly Ser Asp Phe Ser Thr  
 145 150 155 160

Ala His Pro Asp Val Tyr Asp Leu Phe Lys Asn Glu Leu Val Asn Leu  
 165 170 175

Lys Thr Asn Tyr Ser Ala Gly Gly Phe Arg Phe Asp Phe Val Arg Gly

ES 2 604 666 T3

180 185 190

Tyr Ala Pro Glu Arg Ile Ser Ala Trp Met Ser Ala Ser Leu Asp Ser  
 195 200 205

Gly Tyr Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Gly Pro Ser Glu Tyr Pro Ser  
 210 215 220

Trp Asp Trp Arg His Ser Ala Ser Trp Gln Glu Ile Leu Lys Asp Phe  
 225 230 235 240

Thr Asp Ala Ser Asp Cys Ser Val Phe Asp Phe Ala Leu Lys Glu Arg  
 245 250 255

Met Gln Asn Gly Ser Ile Ser Asp Trp Arg Tyr Gly Leu Asn Gly Asn  
 260 265 270

Pro Ser Ala Gln Trp Arg Glu Val Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His  
 275 280 285

Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Pro Leu Gly Gly Gln His His Trp Ala  
 290 295 300

Leu Pro Asp Trp Lys Arg Lys Met Ala Tyr Ala Tyr Ile Leu Ser Ser  
 305 310 315 320

Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met Tyr Asp Trp Gly Met  
 325 330 335

Arg Asp Phe Ile Arg Asn Leu Ile Gln Leu Arg Lys Ser Ala Gly Val  
 340 345 350

Lys Ala Tyr Ser Gly Val Gln Phe His Asp Gly Phe Ser Gly Leu Val  
 355 360 365

Gly Thr Thr Ser Gly Ser Asn Gly Lys Leu Leu Phe Ala Ile Asp Ser  
 370 375 380

Asn Phe Ser Ser Pro Asn Gln Val Ala Gly Gly Ala Trp Asn Leu Ala  
 385 390 395 400

Val Asn Glu Asp Asn Gly Arg Ile Arg Ile Trp Arg Gln  
 405 410

<210> 9

<211> 1242

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

ES 2 604 666 T3

<220>

<223> Secuencia de ADN de nucleótido que codifica la amilasa G4 de *Hahella chejuensis* (cepa KCTC 2396) con M agregado en el extremo N (ADN de Q2SEA8)

<400> 9

```

atggaatcat caggcaaatc aggcgcaggc gttagatttc atggcggcga tgaattatt      60
ctgcaaggct ttcattggaa cgttgtaga acagcagaaa gaaactggta caacatcctg      120
caatcaaaag cacaacaaat ttcagaagat ggctttacag caatttggat gccggttccg      180
tggagagata attcatcatg gcaagcatca tcagatacaa gatttggcgg cgaaggctat      240
ttttgggcag atatggataa aaattcaaga tatggcgatg atggccaact gaaacaagca      300
gcatcagcac tgaaaaataa aggcgttaa gttatttatg atattgttcc gaatcatcat      360
gatagaggcc attcaaatga ttcactgaat ctgccgtcag gccaaggcta ttatagatca      420
gattgctcat catgcgatga tggcgatccg tttatggatg gcggctcaga ttttcaaca      480
gcacatccgg atgtttacga tctgtttaaa aacgaactgg ttaacctgaa acaaaactac      540
tcagcaggcg gctttagatt tgattttggt agaggctatg caccgaaag aatttcagca      600
tggatgtcag catcactgga ttcaggctat tgcgttggcg aactgtggaa aggcccgta      660
gaatatccgt catgggattg gagacattca gcatcatggc aagaaattct gaaagatttt      720
acagatgcat cagattgctc agttttgat tttgactga aagaaagaat gcaaatggc      780
tcaatttcag attggagata tggcctgaat ggcaatccgt cagcacaatg gagagaagtt      840
gcagttacat ttgttgataa tcatgataca ggctattcac cgggcccgct gggcggccaa      900
catcattggg cactgccgga ttggaaaaga aaaatggcat atgcatatat tctgtcatca      960
ccgggcacac cggttgttta ttggccgat atgtatgatt ggggcatgag agattttatt     1020
agaaatctga ttcaactgag aaaatcagca ggcgttaaag catattcagg cgttcaattt     1080
catgatggct tttcaggcct ggttggcaca acatcaggct caaatggcaa actgctgttt     1140
gcaattgatt caaatttttc atcaccgaat caagttgcag gcggcgcgatg gaatctggca     1200
5  gttaatgaag ataatggcag aattagaatt tggagacaat aa                        1242

```

<210> 10

<211> 530

<212> PRT

<213> *Pseudomonas saccharophila*

10 <400> 10

```

Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp
1           5           10           15

```

```

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro
20           25           30

```

ES 2 604 666 T3

Asn Asp Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Gln Ala Ser Thr Ile Ala Ala  
 35 40 45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser  
 50 55 60

Ser Trp Thr Asp Gly Gly Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp  
 65 70 75 80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Arg Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg  
 85 90 95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp  
 100 105 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Gly Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn  
 115 120 125

Leu Pro Ala Gly Gln Gly Phe Trp Arg Asn Asp Cys Ala Asp Pro Gly  
 130 135 140

Asn Tyr Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Ile Gly Gly Glu  
 145 150 155 160

Ser Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp  
 165 170 175

Glu Leu Ala Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe  
 180 185 190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser  
 195 200 205

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Gly Pro  
 210 215 220

Ser Glu Tyr Pro Ser Trp Asp Trp Arg Asn Thr Ala Ser Trp Gln Gln  
 225 230 235 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe  
 245 250 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His  
 260 265 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr



Ser Phe  
530

<210> 11  
<211> 21  
<212> PRT

5 <213> Pseudomonas saccharophila

<400> 11

Met Ser His Ile Leu Arg Ala Ala Val Leu Ala Ala Val Leu Leu Pro  
1 5 10 15

Phe Pro Ala Leu Ala  
20

<210> 12  
<211> 429  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS1776

<400> 12

Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp  
1 5 10 15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro  
20 25 30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Lys Ala Ser Thr Ile Ala Ala  
35 40 45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser  
50 55 60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp  
65 70 75 80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Leu Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg  
85 90 95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp  
100 105 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn  
115 120 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly  
130 135 140

15

ES 2 604 666 T3

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu  
 145 150 155 160  
 Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp  
 165 170 175  
 Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe  
 180 185 190  
 Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser  
 195 200 205  
 Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Ser Pro  
 210 215 220  
 Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Arg Ala Ser Trp Gln Gln  
 225 230 235 240  
 Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe  
 245 250 255  
 Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His  
 260 265 270  
 Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr  
 275 280 285  
 Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly  
 290 295 300  
 Gln His Lys Trp Pro Leu Pro Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala  
 305 310 315 320  
 Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met  
 325 330 335  
 Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg  
 340 345 350  
 Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly  
 355 360 365  
 Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val  
 370 375 380  
 Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Asp Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly





ES 2 604 666 T3

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe  
 180 185 190  
 Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser  
 195 200 205  
 Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Lys Pro  
 210 215 220  
 Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Arg Ala Ser Trp Gln Gln  
 225 230 235 240  
 Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe  
 245 250 255  
 Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys Asp  
 260 265 270  
 Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr  
 275 280 285  
 Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly  
 290 295 300  
 Gln His Lys Trp Pro Leu Pro Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala  
 305 310 315 320  
 Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met  
 325 330 335  
 Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg  
 340 345 350  
 Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly  
 355 360 365  
 Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val  
 370 375 380  
 Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Asp Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly  
 385 390 395 400  
 Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val Trp  
 405 410 415  
 Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly

ES 2 604 666 T3

420 425

<210> 14

<211> 429

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS2020

<400> 14

Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp  
1 5 10 15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro  
20 25 30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Lys Ala Ser Thr Ile Ala Ala  
35 40 45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser  
50 55 60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp  
65 70 75 80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Leu Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg  
85 90 95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp  
100 105 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn  
115 120 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly  
130 135 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu  
145 150 155 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp  
165 170 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe  
180 185 190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser  
195 200 205

ES 2 604 666 T3

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Ser Pro  
 210 215 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Arg Ala Ser Trp Gln Gln  
 225 230 235 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe  
 245 250 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His  
 260 265 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr  
 275 280 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly  
 290 295 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Pro Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala  
 305 310 315 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met  
 325 330 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg  
 340 345 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly  
 355 360 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val  
 370 375 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Asp Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly  
 385 390 395 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Glu Asn Gly Gln Val Arg Val Trp  
 405 410 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly  
 420 425

<210> 15  
 <211> 429  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia de proteínas maduras de pMS2022

ES 2 604 666 T3

<400> 15

Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp  
1 5 10 15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro  
20 25 30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Lys Ala Ser Thr Ile Ala Ala  
35 40 45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser  
50 55 60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp  
65 70 75 80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Leu Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg  
85 90 95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp  
100 105 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn  
115 120 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly  
130 135 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu  
145 150 155 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp  
165 170 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe  
180 185 190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Leu Trp Met Ser  
195 200 205

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Ser Pro  
210 215 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Arg Ala Ser Trp Gln Gln  
225 230 235 240

ES 2 604 666 T3

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe  
245 250 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His  
260 265 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr  
275 280 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly  
290 295 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Pro Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala  
305 310 315 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met  
325 330 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg  
340 345 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly  
355 360 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val  
370 375 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Asp Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly  
385 390 395 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Glu Asn Gly Gln Val Arg Val Trp  
405 410 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly  
420 425

<210> 16

<211> 429

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS2062

<400> 16

Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp  
1 5 10 15

ES 2 604 666 T3

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro  
 20 25 30  
 Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Lys Ala Ser Thr Ile Ala Ala  
 35 40 45  
 Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser  
 50 55 60  
 Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp  
 65 70 75 80  
 His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Leu Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg  
 85 90 95  
 Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp  
 100 105 110  
 Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn  
 115 120 125  
 Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly  
 130 135 140  
 Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu  
 145 150 155 160  
 Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp  
 165 170 175  
 Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe  
 180 185 190  
 Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser  
 195 200 205  
 Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Lys Pro  
 210 215 220  
 Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Arg Ala Ser Trp Gln Glu  
 225 230 235 240  
 Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe  
 245 250 255  
 Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His  
 260 265 270

ES 2 604 666 T3

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr  
 275 280 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly  
 290 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Pro Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala  
 305 310 315 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met  
 325 330 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg  
 340 345 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly  
 355 360 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val  
 370 375 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Asp Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly  
 385 390 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val Trp  
 405 410 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly  
 420 425

<210> 17

<211> 429

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS2171

<400> 17

Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp  
 1 5 10 15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro  
 20 25 30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Lys Ala Ser Thr Ile Ala Ala  
 35 40 45

ES 2 604 666 T3

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser  
 50 55 60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp  
 65 70 75 80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Leu Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg  
 85 90 95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp  
 100 105 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn  
 115 120 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly  
 130 135 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu  
 145 150 155 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp  
 165 170 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe  
 180 185 190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Leu Trp Met Ser  
 195 200 205

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Ala Pro  
 210 215 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Arg Ala Ser Trp Gln Gln  
 225 230 235 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe  
 245 250 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His  
 260 265 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr  
 275 280 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly  
 290 295 300



ES 2 604 666 T3

Gln His Lys Trp Pro Leu Pro Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala  
305 310 315 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met  
325 330 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg  
340 345 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly  
355 360 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val  
370 375 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Asp Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly  
385 390 395 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Glu Asn Gly Gln Val Arg Val Trp  
405 410 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly  
420 425

<210> 18

<211> 429

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS465

<400> 18

Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp  
1 5 10 15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro  
20 25 30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Gln Ala Ser Thr Ile Ala Ala  
35 40 45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser  
50 55 60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp  
65 70 75 80

ES 2 604 666 T3

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Arg Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg  
85 90 95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp  
100 105 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn  
115 120 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly  
130 135 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu  
145 150 155 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp  
165 170 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe  
180 185 190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser  
195 200 205

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Ser Pro  
210 215 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Thr Ala Ser Trp Gln Gln  
225 230 235 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe  
245 250 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His  
260 265 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr  
275 280 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly  
290 295 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Gln Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala  
305 310 315 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met  
325 330 335

ES 2 604 666 T3

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg  
340 345 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly  
355 360 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val  
370 375 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Ala Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly  
385 390 395 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val Trp  
405 410 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly  
420 425

<210> 19

<211> 429

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS1042

<400> 19

Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp  
1 5 10 15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro  
20 25 30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Gln Ala Ser Thr Ile Ala Ala  
35 40 45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser  
50 55 60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp  
65 70 75 80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Arg Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg  
85 90 95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp  
100 105 110

ES 2 604 666 T3

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn  
115 120 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly  
130 135 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu  
145 150 155 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp  
165 170 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe  
180 185 190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser  
195 200 205

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Glu Pro  
210 215 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Thr Ala Ser Trp Gln Gln  
225 230 235 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe  
245 250 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His  
260 265 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr  
275 280 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly  
290 295 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Pro Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala  
305 310 315 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met  
325 330 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg  
340 345 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly  
355 360 365

ES 2 604 666 T3

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val  
 370 375 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Ala Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly  
 385 390 395 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val Trp  
 405 410 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly  
 420 425

<210> 20

<211> 429

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS1104

<400> 20

Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp  
 1 5 10 15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro  
 20 25 30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Lys Ala Ser Thr Ile Ala Ala  
 35 40 45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser  
 50 55 60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp  
 65 70 75 80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Arg Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg  
 85 90 95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp  
 100 105 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn  
 115 120 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly  
 130 135 140

ES 2 604 666 T3

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu  
 145 150 155 160  
 Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp  
 165 170 175  
 Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe  
 180 185 190  
 Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser  
 195 200 205  
 Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Glu Pro  
 210 215 220  
 Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Thr Ala Ser Trp Gln Gln  
 225 230 235 240  
 Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe  
 245 250 255  
 Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His  
 260 265 270  
 Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr  
 275 280 285  
 Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly  
 290 295 300  
 Gln His Lys Trp Pro Leu Gln Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala  
 305 310 315 320  
 Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met  
 325 330 335  
 Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg  
 340 345 350  
 Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly  
 355 360 365  
 Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val  
 370 375 380  
 Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Ala Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly  
 385 390 395 400

ES 2 604 666 T3

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val Trp  
 405 410 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly  
 420 425

<210> 21  
 <211> 429  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de proteínas maduras de pMS1153

<400> 21

Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp  
 1 5 10 15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro  
 20 25 30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Gln Ala Ser Thr Ile Ala Ala  
 35 40 45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser  
 50 55 60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp  
 65 70 75 80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Leu Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg  
 85 90 95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp  
 100 105 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn  
 115 120 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly  
 130 135 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu  
 145 150 155 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp  
 165 170 175

ES 2 604 666 T3

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe  
 180 185 190  
 Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser  
 195 200 205  
 Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Glu Pro  
 210 215 220  
 Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Thr Ala Ser Trp Gln Gln  
 225 230 235 240  
 Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe  
 245 250 255  
 Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His  
 260 265 270  
 Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr  
 275 280 285  
 Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly  
 290 295 300  
 Gln His Lys Trp Pro Leu Gln Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala  
 305 310 315 320  
 Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met  
 325 330 335  
 Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg  
 340 345 350  
 Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly  
 355 360 365  
 Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val  
 370 375 380  
 Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Ala Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly  
 385 390 395 400  
 Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val Trp  
 405 410 415  
 Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly  
 420 425



ES 2 604 666 T3

<210> 22  
 <211> 429  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Secuencia de proteínas maduras de pMS1286

<400> 22

Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp  
 1 5 10 15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro  
 20 25 30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Gln Ala Ser Thr Ile Ala Ala  
 35 40 45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser  
 50 55 60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp  
 65 70 75 80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Arg Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg  
 85 90 95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp  
 100 105 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn  
 115 120 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly  
 130 135 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu  
 145 150 155 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp  
 165 170 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe  
 180 185 190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser  
 195 200 205

ES 2 604 666 T3

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Glu Pro  
 210 215 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Arg Ala Ser Trp Gln Gln  
 225 230 235 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe  
 245 250 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His  
 260 265 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr  
 275 280 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly  
 290 295 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Gln Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala  
 305 310 315 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met  
 325 330 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg  
 340 345 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly  
 355 360 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val  
 370 375 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Ala Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly  
 385 390 395 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val Trp  
 405 410 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly  
 420 425

<210> 23

<211> 429

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS1284

ES 2 604 666 T3

<400> 23

Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp  
1 5 10 15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro  
20 25 30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Gln Ala Ser Thr Ile Ala Ala  
35 40 45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser  
50 55 60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp  
65 70 75 80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Arg Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg  
85 90 95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp  
100 105 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn  
115 120 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly  
130 135 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu  
145 150 155 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp  
165 170 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe  
180 185 190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser  
195 200 205

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Glu Pro  
210 215 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Arg Ala Ser Trp Gln Gln  
225 230 235 240

ES 2 604 666 T3

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe  
245 250 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His  
260 265 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr  
275 280 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly  
290 295 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Pro Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala  
305 310 315 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met  
325 330 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg  
340 345 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly  
355 360 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val  
370 375 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Ala Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly  
385 390 395 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val Trp  
405 410 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly  
420 425

<210> 24

<211> 429

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS1290

<400> 24

Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp  
1 5 10 15

ES 2 604 666 T3

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro  
 20 25 30  
 Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Gln Ala Ser Thr Ile Ala Ala  
 35 40 45  
 Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser  
 50 55 60  
 Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp  
 65 70 75 80  
 His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Arg Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg  
 85 90 95  
 Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp  
 100 105 110  
 Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn  
 115 120 125  
 Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly  
 130 135 140  
 Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu  
 145 150 155 160  
 Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp  
 165 170 175  
 Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe  
 180 185 190  
 Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser  
 195 200 205  
 Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Glu Pro  
 210 215 220  
 Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Lys Ala Ser Trp Gln Gln  
 225 230 235 240  
 Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe  
 245 250 255  
 Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His  
 260 265 270

ES 2 604 666 T3

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr  
 275 280 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly  
 290 295 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Gln Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala  
 305 310 315 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met  
 325 330 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg  
 340 345 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly  
 355 360 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val  
 370 375 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Ala Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly  
 385 390 395 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val Trp  
 405 410 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly  
 420 425

<210> 25

<211> 429

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS1484

<400> 25

Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp  
 1 5 10 15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro  
 20 25 30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Gln Ala Ser Thr Ile Ala Ala  
 35 40 45

ES 2 604 666 T3

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser  
 50 55 60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp  
 65 70 75 80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Arg Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg  
 85 90 95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp  
 100 105 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn  
 115 120 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly  
 130 135 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu  
 145 150 155 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp  
 165 170 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe  
 180 185 190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Leu Trp Met Ser  
 195 200 205

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Glu Pro  
 210 215 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Thr Ala Ser Trp Gln Gln  
 225 230 235 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe  
 245 250 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His  
 260 265 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr  
 275 280 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly  
 290 295 300

ES 2 604 666 T3

Gln His Lys Trp Pro Leu Gln Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala  
305 310 315 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met  
325 330 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg  
340 345 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly  
355 360 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val  
370 375 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Ala Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly  
385 390 395 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val Trp  
405 410 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly  
420 425

<210> 26

<211> 429

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS1579

<400> 26

Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp  
1 5 10 15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro  
20 25 30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Gln Ala Ser Thr Ile Ala Ala  
35 40 45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser  
50 55 60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp  
65 70 75 80



ES 2 604 666 T3

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Arg Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg  
85 90 95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp  
100 105 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn  
115 120 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly  
130 135 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu  
145 150 155 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp  
165 170 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe  
180 185 190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser  
195 200 205

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Glu Pro  
210 215 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Thr Ala Ser Trp Gln Gln  
225 230 235 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe  
245 250 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His  
260 265 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr  
275 280 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly  
290 295 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Gln Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala  
305 310 315 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met  
325 330 335

ES 2 604 666 T3

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg  
 340 345 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly  
 355 360 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val  
 370 375 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Ala Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly  
 385 390 395 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Glu Asn Gly Gln Val Arg Val Trp  
 405 410 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly  
 420 425

- <210> 27
- <211> 429
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

5

- <220>
- <223> Secuencia de proteínas maduras de pMS1105

<400> 27

Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp  
 1 5 10 15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro  
 20 25 30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Lys Ala Ser Thr Ile Ala Ala  
 35 40 45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser  
 50 55 60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp  
 65 70 75 80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Arg Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg  
 85 90 95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp  
 100 105 110

ES 2 604 666 T3

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn  
115 120 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly  
130 135 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu  
145 150 155 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp  
165 170 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe  
180 185 190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser  
195 200 205

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Ser Pro  
210 215 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Thr Ala Ser Trp Gln Gln  
225 230 235 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe  
245 250 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His  
260 265 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr  
275 280 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly  
290 295 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Gln Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala  
305 310 315 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met  
325 330 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg  
340 345 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly  
355 360 365

ES 2 604 666 T3

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val  
 370 375 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Ala Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly  
 385 390 395 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val Trp  
 405 410 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly  
 420 425

<210> 28  
 <211> 429  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de proteínas maduras de pMS1723  
 <400> 28

Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp  
 1 5 10 15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro  
 20 25 30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Lys Ala Ser Thr Ile Ala Ala  
 35 40 45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser  
 50 55 60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp  
 65 70 75 80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Arg Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg  
 85 90 95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp  
 100 105 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn  
 115 120 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly  
 130 135 140

ES 2 604 666 T3

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu  
 145 150 155 160  
 Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp  
 165 170 175  
 Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe  
 180 185 190  
 Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser  
 195 200 205  
 Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Ser Pro  
 210 215 220  
 Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Thr Ala Ser Trp Gln Gln  
 225 230 235 240  
 Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe  
 245 250 255  
 Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His  
 260 265 270  
 Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr  
 275 280 285  
 Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly  
 290 295 300  
 Gln His Lys Trp Pro Leu Gln Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala  
 305 310 315 320  
 Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met  
 325 330 335  
 Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg  
 340 345 350  
 Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly  
 355 360 365  
 Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val  
 370 375 380  
 Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Asp Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly  
 385 390 395 400

ES 2 604 666 T3

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val Trp  
 405 410 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly  
 420 425

<210> 29

<211> 429

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS2104

<400> 29

Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp  
 1 5 10 15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro  
 20 25 30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Lys Ala Ser Thr Ile Ala Ala  
 35 40 45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser  
 50 55 60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp  
 65 70 75 80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Leu Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg  
 85 90 95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp  
 100 105 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn  
 115 120 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly  
 130 135 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu  
 145 150 155 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp  
 165 170 175

ES 2 604 666 T3

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe  
 180 185 190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser  
 195 200 205

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Ala Pro  
 210 215 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Arg Ala Ser Trp Gln Gln  
 225 230 235 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe  
 245 250 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His  
 260 265 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr  
 275 280 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly  
 290 295 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Pro Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala  
 305 310 315 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met  
 325 330 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg  
 340 345 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly  
 355 360 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val  
 370 375 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Asp Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly  
 385 390 395 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val Trp  
 405 410 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly  
 420 425

ES 2 604 666 T3

<210> 30  
 <211> 429  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Secuencia de proteínas maduras de pMS2138

<400> 30

Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp  
 1 5 10 15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro  
 20 25 30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Lys Ala Ser Thr Ile Ala Ala  
 35 40 45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser  
 50 55 60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp  
 65 70 75 80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Leu Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg  
 85 90 95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp  
 100 105 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn  
 115 120 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly  
 130 135 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu  
 145 150 155 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp  
 165 170 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe  
 180 185 190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Leu Trp Met Ser  
 195 200 205



ES 2 604 666 T3

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Ser Pro  
 210 215 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Arg Ala Ser Trp Gln Gln  
 225 230 235 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe  
 245 250 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His  
 260 265 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr  
 275 280 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly  
 290 295 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Pro Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala  
 305 310 315 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met  
 325 330 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg  
 340 345 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly  
 355 360 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val  
 370 375 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Asp Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly  
 385 390 395 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val Trp  
 405 410 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly  
 420 425

<210> 31  
 <211> 429  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia de proteínas maduras de pMS2124

ES 2 604 666 T3

<400> 31

Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp  
1 5 10 15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro  
20 25 30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Lys Ala Ser Thr Ile Ala Ala  
35 40 45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser  
50 55 60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp  
65 70 75 80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Leu Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg  
85 90 95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp  
100 105 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn  
115 120 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly  
130 135 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu  
145 150 155 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp  
165 170 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe  
180 185 190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Leu Trp Met Ser  
195 200 205

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Lys Pro  
210 215 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Arg Ala Ser Trp Gln Glu  
225 230 235 240

ES 2 604 666 T3

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe  
245 250 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His  
260 265 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr  
275 280 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly  
290 295 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Pro Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala  
305 310 315 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met  
325 330 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg  
340 345 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly  
355 360 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val  
370 375 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Asp Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly  
385 390 395 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Glu Asn Gly Gln Val Arg Val Trp  
405 410 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly  
420 425

<210> 32

<211> 429

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS2177

<400> 32

Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp  
1 5 10 15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro

ES 2 604 666 T3

	20		25		30											
Tyr	Gln	Trp	Tyr	Asn	Ile	Leu	Arg	Gln	Lys	Ala	Ser	Thr	Ile	Ala	Ala	
	35						40					45				
Asp	Gly	Phe	Ser	Ala	Ile	Trp	Met	Pro	Val	Pro	Trp	Arg	Asp	Phe	Ser	
	50					55					60					
Ser	Trp	Thr	Asp	Gly	Asp	Lys	Ser	Gly	Gly	Gly	Glu	Gly	Tyr	Phe	Trp	
65					70					75					80	
His	Asp	Phe	Asn	Lys	Asn	Gly	Leu	Tyr	Gly	Ser	Asp	Ala	Gln	Leu	Arg	
				85					90					95		
Gln	Ala	Ala	Gly	Ala	Leu	Gly	Gly	Ala	Gly	Val	Lys	Val	Leu	Tyr	Asp	
			100					105					110			
Val	Val	Pro	Asn	His	Met	Asn	Arg	Phe	Tyr	Pro	Asp	Lys	Glu	Ile	Asn	
		115					120					125				
Leu	Pro	Ala	Gly	Gln	Arg	Phe	Trp	Arg	Asn	Asp	Cys	Pro	Asp	Pro	Gly	
	130					135					140					
Asn	Gly	Pro	Asn	Asp	Cys	Asp	Asp	Gly	Asp	Arg	Phe	Leu	Gly	Gly	Glu	
145					150					155					160	
Ala	Asp	Leu	Asn	Thr	Gly	His	Pro	Gln	Ile	Tyr	Gly	Met	Phe	Arg	Asp	
				165					170					175		
Glu	Phe	Thr	Asn	Leu	Arg	Ser	Gly	Tyr	Gly	Ala	Gly	Gly	Phe	Arg	Phe	
			180					185					190			
Asp	Phe	Val	Arg	Gly	Tyr	Ala	Pro	Glu	Arg	Val	Asp	Leu	Trp	Met	Ser	
		195					200					205				
Asp	Ser	Ala	Asp	Ser	Ser	Phe	Cys	Val	Gly	Glu	Leu	Trp	Lys	Lys	Pro	
	210					215					220					
Ser	Glu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Trp	Arg	Asn	Arg	Ala	Ser	Trp	Gln	Glu	
225					230					235					240	
Ile	Ile	Lys	Asp	Trp	Ser	Asp	Arg	Ala	Lys	Cys	Pro	Val	Phe	Asp	Phe	
				245					250					255		
Ala	Leu	Lys	Glu	Arg	Met	Gln	Asn	Gly	Ser	Val	Ala	Asp	Trp	Lys	His	
			260					265					270			

ES 2 604 666 T3

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr  
 275 280 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly  
 290 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Pro Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala  
 305 310 315 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met  
 325 330 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg  
 340 345 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly  
 355 360 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val  
 370 375 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Asp Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly  
 385 390 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Glu Asn Gly Gln Val Arg Val Trp  
 405 410 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly  
 420 425

<210> 33

<211> 429

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS2178

<400> 33

Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp  
 1 5 10 15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro  
 20 25 30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Lys Ala Ser Thr Ile Ala Ala  
 35 40 45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser

ES 2 604 666 T3

50                                      55                                      60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp  
65                                      70                                      75                                      80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Leu Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg  
85                                      90                                      95

Gln Ala Ala Gln Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp  
100                                      105                                      110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn  
115                                      120                                      125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly  
130                                      135                                      140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu  
145                                      150                                      155                                      160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp  
165                                      170                                      175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe  
180                                      185                                      190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Leu Trp Met Ser  
195                                      200                                      205

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Lys Pro  
210                                      215                                      220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Arg Ala Ser Trp Gln Glu  
225                                      230                                      235                                      240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe  
245                                      250                                      255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His  
260                                      265                                      270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr  
275                                      280                                      285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly  
290                                      295                                      300

ES 2 604 666 T3

Gln His Lys Trp Pro Leu Pro Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala  
305 310 315 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met  
325 330 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg  
340 345 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly  
355 360 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val  
370 375 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Asp Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly  
385 390 395 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Glu Asn Gly Gln Val Arg Val Trp  
405 410 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly  
420 425

- <210> 34
- <211> 429
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

5

- <220>
- <223> Secuencia de proteínas maduras de pMS2118

<400> 34

Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp  
1 5 10 15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro  
20 25 30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Lys Ala Ser Thr Ile Ala Ala  
35 40 45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser  
50 55 60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp  
65 70 75 80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Leu Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg

ES 2 604 666 T3

				85						90					95
Gln	Ala	Ala	Gly	Ala	Leu	Gly	Gly	Ala	Gly	Val	Lys	Val	Leu	Tyr	Asp
			100					105					110		
Val	Val	Pro	Asn	His	Met	Asn	Arg	Phe	Tyr	Pro	Asp	Lys	Glu	Ile	Asn
		115					120					125			
Leu	Pro	Ala	Gly	Gln	Arg	Phe	Trp	Arg	Asn	Asp	Cys	Pro	Asp	Pro	Gly
	130					135					140				
Asn	Gly	Pro	Asn	Asp	Cys	Asp	Asp	Gly	Asp	Arg	Phe	Leu	Gly	Gly	Glu
145					150					155					160
Ala	Asp	Leu	Asn	Thr	Gly	His	Pro	Gln	Ile	Tyr	Gly	Met	Phe	Arg	Asp
				165					170						175
Glu	Phe	Thr	Asn	Leu	Arg	Ser	Gly	Tyr	Gly	Ala	Gly	Gly	Phe	Arg	Phe
			180					185					190		
Asp	Phe	Val	Arg	Gly	Tyr	Ala	Pro	Glu	Arg	Val	Asp	Leu	Trp	Met	Ser
		195					200					205			
Asp	Ser	Ala	Asp	Ser	Ser	Phe	Cys	Val	Gly	Glu	Leu	Trp	Lys	Ser	Pro
	210					215					220				
Ser	Glu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Trp	Arg	Asn	Arg	Ala	Ser	Trp	Gln	Glu
225					230					235					240
Ile	Ile	Lys	Asp	Trp	Ser	Asp	Arg	Ala	Lys	Cys	Pro	Val	Phe	Asp	Phe
				245					250					255	
Ala	Leu	Lys	Glu	Arg	Met	Gln	Asn	Gly	Ser	Val	Ala	Asp	Trp	Lys	His
			260					265					270		
Gly	Leu	Asn	Gly	Asn	Pro	Asp	Pro	Arg	Trp	Arg	Glu	Val	Ala	Val	Thr
		275					280					285			
Phe	Val	Asp	Asn	His	Asp	Thr	Gly	Tyr	Ser	Pro	Gly	Gln	Asn	Gly	Gly
	290					295					300				
Gln	His	Lys	Trp	Pro	Leu	Pro	Asp	Gly	Leu	Ile	Arg	Gln	Ala	Tyr	Ala
305					310					315					320
Tyr	Ile	Leu	Thr	Ser	Pro	Gly	Thr	Pro	Val	Val	Tyr	Trp	Pro	His	Met
				325					330					335	



ES 2 604 666 T3

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg  
 340 345 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly  
 355 360 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val  
 370 375 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Asp Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly  
 385 390 395 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Glu Asn Gly Gln Val Arg Val Trp  
 405 410 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly  
 420 425

<210> 35  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia Enlazadora  
 <400> 35

Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly  
 1 5 10

10 <210> 36  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Sequence of PS4 SBD  
 <400> 36

Glu Gly Gly Leu Val Asn Val Asn Phe Arg Cys Asp Asn Gly Val Thr  
 1 5 10 15

Gln Met Gly Asp Ser Val Tyr Ala Val Gly Asn Val Ser Gln Leu Gly  
 20 25 30

Asn Trp Ser Pro Ala Ser Ala Val Arg Leu Thr Asp Thr Ser Ser Tyr  
 35 40 45

Pro Thr Trp Lys Gly Ser Ile Ala Leu Pro Asp Gly Gln Asn Val Glu  
 50 55 60

ES 2 604 666 T3

Trp Lys Cys Leu Ile Arg Asn Glu Ala Asp Ala Thr Leu Val Arg Gln  
65 70 75 80

Trp Gln Ser Gly Gly Asn Asn Gln Val Gln Ala Ala Ala Gly Ala Ser  
85 90 95

Thr Ser Gly Ser Phe  
100

<210> 37  
<211> 13  
<212> PRT  
5 <213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Residuos de aminoácidos en las posiciones 13-26 de SEQ ID NO: 1  
  
<400> 37

His Gly Gly Asp Glu Ile Ile Leu Gln Phe His Trp Asn  
1 5 10

10 <210> 38  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
15 <223> Secuencia de unidad artificial  
  
<220>  
<221> CARACTERÍSTICA\_NUEVA  
<222> (4)..(4)  
<223> Xaa en la posición 4 es S o T  
20 <220>  
<221> CARACTERÍSTICA\_NUEVA  
<222> (8)..(8)  
<223> Xaa en la posición 8 es M o L  
  
<220>  
25 <221> CARACTERÍSTICA\_NUEVA  
<222> (10)..(10)  
<223> Xaa en la posición 10 es cualquier residuo de aminoácido de origen natural  
  
<220>  
30 <221> CARACTERÍSTICA\_NUEVA  
<222> (15)..(15)  
<223> Xaa en la posición 10 es cualquier residuo de aminoácido de origen natural  
  
<400> 38

Asp Gly Phe Xaa Ala Ile Trp Xaa Pro Xaa Pro Trp Arg Asp Xaa Ser  
1 5 10 15

Ser Trp

35 <210> 39  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>

<223> Subsecuencia artificial  
 <400> 39

**Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp**  
 1 5

5 <210> 40  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Artificial subsequence

10 <400> 40

**Val Pro Asn His**  
 1

<210> 41  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Artificial subsequence

<400> 41

**Cys Asp Asp Gly Asp**  
 1 5

20 <210> 42  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 25 <223> Subsecuencia artificial

<400> 42

**Ala Gly Gly Phe Arg Phe Asp Phe Val Arg Gly**  
 1 5 10

30 <210> 43  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Subsecuencia artificial

<400> 43

**Phe Ala Leu Lys**  
 35 1

<210> 44  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Subsecuencia artificial

<400> 44

**Trp Arg Glu Val Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp**  
**1 5 10**  
 5 <210> 45  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Subsecuencia artificial  
 <400> 45  
**Gly Tyr Ser Pro Gly**  
**1 5**  
 10 <210> 46  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Subsecuencia artificial  
 <400> 46  
**Gly Gln His**  
**1**  
 20 <210> 47  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Subsecuencia artificial  
 <400> 47  
 25 **Ala Tyr Ala Tyr Ile**  
**1 5**  
 30 <210> 48  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Subsecuencia artificial  
 <400> 48  
**Ser Pro Gly Thr Pro**  
**1 5**  
 35 <210> 49  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 40 <223> Subsecuencia artificial  
 <400> 49  
**Val Tyr Trp**  
**1**

ES 2 604 666 T3

<210> 50  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Subsecuencia artificial

<400> 50

His Met Tyr Asp Trp Gly  
1 5

10 <210> 51  
<211> 686  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia AA de Novamyl

15 <400> 51

Ser Ser Ser Ala Ser Val Lys Gly Asp Val Ile Tyr Gln Ile Ile Ile  
1 5 10 15

Asp Arg Phe Tyr Asp Gly Asp Thr Thr Asn Asn Asn Pro Ala Lys Ser  
20 25 30

ES 2 604 666 T3

Tyr Gly Leu Tyr Asp Pro Thr Lys Ser Lys Trp Lys Met Tyr Trp Gly  
 35 40 45  
 Gly Asp Leu Glu Gly Val Arg Gln Lys Leu Pro Tyr Leu Lys Gln Leu  
 50 55 60  
 Gly Val Thr Thr Ile Trp Leu Ser Pro Val Leu Asp Asn Leu Asp Thr  
 65 70 75 80  
 Leu Ala Gly Thr Asp Asn Thr Gly Tyr His Gly Tyr Trp Thr Arg Asp  
 85 90 95  
 Phe Lys Gln Ile Glu Glu His Phe Gly Asn Trp Thr Thr Phe Asp Thr  
 100 105 110  
 Leu Val Asn Asp Ala His Gln Asn Gly Ile Lys Val Ile Val Asp Phe  
 115 120 125  
 Val Pro Asn His Ser Thr Pro Phe Lys Ala Asn Asp Ser Thr Phe Ala  
 130 135 140  
 Glu Gly Gly Ala Leu Tyr Asn Asn Gly Thr Tyr Met Gly Asn Tyr Phe  
 145 150 155 160  
 Asp Asp Ala Thr Lys Gly Tyr Phe His His Asn Gly Asp Ile Ser Asn  
 165 170 175  
 Trp Asp Asp Arg Tyr Glu Ala Gln Trp Lys Asn Phe Thr Asp Pro Ala  
 180 185 190  
 Gly Phe Ser Leu Ala Asp Leu Ser Gln Glu Asn Gly Thr Ile Ala Gln  
 195 200 205  
 Tyr Leu Thr Asp Ala Ala Val Gln Leu Val Ala His Gly Ala Asp Gly  
 210 215 220  
 Leu Arg Ile Asp Ala Val Lys His Phe Asn Ser Gly Phe Ser Lys Ser  
 225 230 235 240  
 Leu Ala Asp Lys Leu Tyr Gln Lys Lys Asp Ile Phe Leu Val Gly Glu  
 245 250 255  
 Trp Tyr Gly Asp Asp Pro Gly Thr Ala Asn His Leu Glu Lys Val Arg  
 260 265 270  
 Tyr Ala Asn Asn Ser Gly Val Asn Val Leu Asp Phe Asp Leu Asn Thr  
 275 280 285

ES 2 604 666 T3

Val Ile Arg Asn Val Phe Gly Thr Phe Thr Gln Thr Met Tyr Asp Leu  
 290 295 300

Asn Asn Met Val Asn Gln Thr Gly Asn Glu Tyr Lys Tyr Lys Glu Asn  
 305 310 315 320

Leu Ile Thr Phe Ile Asp Asn His Asp Met Ser Arg Phe Leu Ser Val  
 325 330 335

Asn Ser Asn Lys Ala Asn Leu His Gln Ala Leu Ala Phe Ile Leu Thr  
 340 345 350

Ser Arg Gly Thr Pro Ser Ile Tyr Tyr Gly Thr Glu Gln Tyr Met Ala  
 355 360 365

Gly Gly Asn Asp Pro Tyr Asn Arg Gly Met Met Pro Ala Phe Asp Thr  
 370 375 380

Thr Thr Thr Ala Phe Lys Glu Val Ser Thr Leu Ala Gly Leu Arg Arg  
 385 390 395 400

Asn Asn Ala Ala Ile Gln Tyr Gly Thr Thr Thr Gln Arg Trp Ile Asn  
 405 410 415

Asn Asp Val Tyr Ile Tyr Glu Arg Lys Phe Phe Asn Asp Val Val Leu  
 420 425 430

Val Ala Ile Asn Arg Asn Thr Gln Ser Ser Tyr Ser Ile Ser Gly Leu  
 435 440 445

Gln Thr Ala Leu Pro Asn Gly Ser Tyr Ala Asp Tyr Leu Ser Gly Leu  
 450 455 460

Leu Gly Gly Asn Gly Ile Ser Val Ser Asn Gly Ser Val Ala Ser Phe  
 465 470 475 480

Thr Leu Ala Pro Gly Ala Val Ser Val Trp Gln Tyr Ser Thr Ser Ala  
 485 490 495

Ser Ala Pro Gln Ile Gly Ser Val Ala Pro Asn Met Gly Ile Pro Gly  
 500 505 510

Asn Val Val Thr Ile Asp Gly Lys Gly Phe Gly Thr Thr Gln Gly Thr  
 515 520 525

Val Thr Phe Gly Gly Val Thr Ala Thr Val Lys Ser Trp Thr Ser Asn  
 530 535 540

ES 2 604 666 T3

Arg Ile Glu Val Tyr Val Pro Asn Met Ala Ala Gly Leu Thr Asp Val  
545 550 555 560

Lys Val Thr Ala Gly Gly Val Ser Ser Asn Leu Tyr Ser Tyr Asn Ile  
565 570 575

Leu Ser Gly Thr Gln Thr Ser Val Val Phe Thr Val Lys Ser Ala Pro  
580 585 590

Pro Thr Asn Leu Gly Asp Lys Ile Tyr Leu Thr Gly Asn Ile Pro Glu  
595 600 605

Leu Gly Asn Trp Ser Thr Asp Thr Ser Gly Ala Val Asn Asn Ala Gln  
610 615 620

Gly Pro Leu Leu Ala Pro Asn Tyr Pro Asp Trp Phe Tyr Val Phe Ser  
625 630 635 640

Val Pro Ala Gly Lys Thr Ile Gln Phe Lys Phe Phe Ile Lys Arg Ala  
645 650 655

Asp Gly Thr Ile Gln Trp Glu Asn Gly Ser Asn His Val Ala Thr Thr  
660 665 670

Pro Thr Gly Ala Thr Gly Asn Ile Thr Val Thr Trp Gln Asn  
675 680 685

<210> 52

<211> 1290

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótido de pMS382

<400> 52

```

gatcaagcag gaaaaagccc ggcaggcgtc agatatcatg gcggcgatga aatcatcctt      60
cagggctttc attggaacgt cgtcagagaa gcgccgtata actggtataa catcctgaga      120
caacaagcga gcacaattgc cgctgatggc ttttccgcaa tctggatgcc ggttccgtgg      180
agagatttta gcagctggac ggatggagat aaaagcggag gcggcgaagg atatttttgg      240
catgacttta acaaaaacgg ccgctatgga agcgatgctc aactgagaca agcagcagga      300
gcacttggag gagcaggagt caaagtcctg tacgatgtcg tcccgaacca tatgaaccgc      360
ttttatccgg acaaagaaat caatctgccg gcaggccaaa gattttggag aaacgattgc      420
ccggaccggg gaaatggacc gaatgattgc gatgatggcg atagatttct gggcggcgaa      480

```



ES 2 604 666 T3

gcggatctga atacaggcca tccgcaaatac tatggcatgt ttcgggacga atttacgaat 540  
 ctgagaagcg gatatggagc gggcggattt cgctttgatt ttgtcagagg ctatgccccg 600  
 gaaagagttg atagctggat gagcgattca gcggatagca gcttttgctg cggcgaactt 660  
 tggaaagaac cgagcgaata tccgccgtgg gattggagaa atacagcgag ctggcagcag 720  
 atcatcaaag attggagcga tagagcaaaa tgcccgtctt ttgactttgc cctgaaagaa 780  
 cgcatgcaaa atggaagcgt cgccgattgg aaacatggcc tgaacggaaa tccggacccg 840  
 agatggagag aagtcgccgt cacgtttgtc gataaccatg acacaggata tagccccgga 900  
 caaaatggag gacaacataa atggccgctt caagatggcc ttatcagaca ggcgtatgcc 960  
 tatatcctta catcaccggg aacaccggtt gtttattggc cgcatatgta tgattggggc 1020  
 tatggcgatt tcatccgcca actgatccag gttagaagaa cagcaggagt cagagcggat 1080  
 agcgcatta gctttcatag cggctatagc ggacttgtcg ctacagttag cggcagccaa 1140  
 caaacactgg tcgtcgccct gaatagcgat ctggcaaatac cgggacaagt tgctagcggc 1200  
 agcttttagcg aagcagtcaa tgccagcaat ggccaagtca gagtctggag aagcgggaagc 1260  
 ggagatggag gaggaaatga cggaggataa 1290  
 <210> 53  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de ADN  
 <400> 53  
 gtataacatc ctgagacaaa aagcgagcac aattgcc 38  
 10 <210> 54  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Cebador de ADN  
 <400> 54  
 gtataacatc ctgagacaaa acgagagcac aattgcc 37  
 <210> 55  
 <211> 41  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de ADN  
 <400> 55  
 25 gcatgacttt acaaaaaacg gcctgtatgg aagcgtatgct c 41  
 <210> 56  
 <211> 45  
 <212> ADN

ES 2 604 666 T3

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de ADN  
 <400> 56

5 ggcatgactt taacaaaaac ggctattatg gaagcgatgc tcaac 45  
 <210> 57  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador de ADN  
 <400> 57

ggcatgactt taacaaaaac ggcaaatatg gaagcgatgc tcaac 45

15 <210> 58  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador de ADN

20 <400> 58

gccccgaaa gagttgatct gtggatgagc gattcagcg 39

<210> 59  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador de ADN  
 <400> 59

gtgggattgg agaaatagag cgagctggca gc 32

30 <210> 60  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 35 <223> Cebador de ADN  
 <400> 60

gtgggattgg agaaataaag cgagctggca gc 32

<210> 61  
 <211> 37  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador de ADN  
 <400> 61

45 gccgtgggat tggagaaatc atgcgagctg gcagcag 37  
 <210> 62

<211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Cebador de ADN  
  
 <400> 62  
  
 ccgtgggatt ggagaaatca ggcgagctgg cagcag 36  
  
 <210> 63  
 <211> 36  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador de ADN  
  
 <400> 63  
  
 15 cgctccaatc ttgatgatt tctgccagc tcgctg 36  
  
 <210> 64  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 20 <220>  
 <223> Cebador de ADN  
  
 <400> 64  
  
 cagcgagctg gcaggatc atcaaagatt ggagcg 36  
  
 <210> 65  
 <211> 39  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador de ADN  
  
 <400> 65  
  
 30 caacataaat ggccgcttc ggatggcctt atcagacag 39  
  
 <210> 66  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador de ADN  
  
 <400> 66  
  
 gccctgaata gcgatctgga taatccggga caagttgc 38  
  
 <210> 67  
 <211> 42  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 45 <223> Cebador de ADN  
  
 <400> 67  
  
 cgccctgaat agcgatctgt ataatccggg acaagttgct ag 42

ES 2 604 666 T3

<210> 68  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Cebador de ADN  
 <400> 68  
 gcgaagcagt caatgccgaa aatggccaag tcagagtctg 40  
 10 <210> 69  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de ADN  
 15 <400> 69  
 catcaaagat tggagcgatc atgcaaaatg cccggtctt gac 43  
 <210> 70  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de ADN  
 <400> 70  
 cgcatgcaaa atggaacggt cgccgattgg aaacatg 37  
 25 <210> 71  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> Cebador de ADN  
 <400> 71  
 ctaccgtcga tggcagccag cagac 25  
 <210> 72  
 <211> 25  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de ADN  
 <400> 72  
 40 ctacagttga tggcagccaa caaac 25

## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que tiene actividad amilasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 78 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y en donde el polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 235 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1, dicho polipéptido tiene una mayor termoestabilidad cuando se compara con la SEQ ID NO: 1.
2. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: 235, 88, 205, 240, 248, 266, 311, 377 ó 409 y/o una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K/A/V/N/I/H/F, 34Q, 100Q/K/N/R, 272D o 392K/D/E/Y/N/Q/R/S/T/G.
3. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde el polipéptido comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: 235, 88, 205, 240, 311 o 409 y/o una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K/N/I/H/F, 272D o 392 K/D/E/Y/N/Q/R/S/T/G.
4. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el polipéptido comprende sustituciones de aminoácidos al menos en cuatro, cinco o en todas las siguientes posiciones: 88, 205, 235, 240, 311 o 409 y/o tiene al menos una o dos de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K/N/I/H/F, 272D o 392 K/D/E/Y/N/Q/R/S/T/G.
5. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el polipéptido comprende además una o más de los siguientes aminoácidos 33Y, 34N, 70D, 121F, 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E/S/K/A, 229P, 307K, 309P y 334P.
6. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el polipéptido tiene al menos cuatro, cinco, seis, siete u ocho de los siguientes aminoácidos 42K, 88L, 205L, 235R, 240E, 272D, 311P, 392D o 409E.
7. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 223A/K/S.
8. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 que tiene al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.
9. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 88.
10. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 88L.
11. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el polipéptido tiene el aminoácido 235R.
12. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el polipéptido comprende además una o más de los siguientes aminoácidos 121F, 134R, 141P, 229P o 307K.
13. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34.
14. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13 que tiene un ligador fusionado en el extremo C.
15. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14 que tiene exoactividad amilasa.
16. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-15 que tiene exoactividad amilasa no maltogénica.
17. Un ácido nucleico capaz de codificar un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16.
18. Un vector de expresión vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 17, o capaz de expresar un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16.
19. Un plásmido que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 17.
20. Una célula huésped que comprende, preferentemente transformada con, un plásmido de acuerdo con la reivindicación 19 o un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 18.

21. Uso de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16 como un aditivo de alimentos o de piensos.
22. Un método de preparación de un jarabe de sacárido, que comprende agregar un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16 a un licuado de almidón granular para formar el jarabe de sacárido.
- 5 23. Un producto alimenticio que comprende un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16.

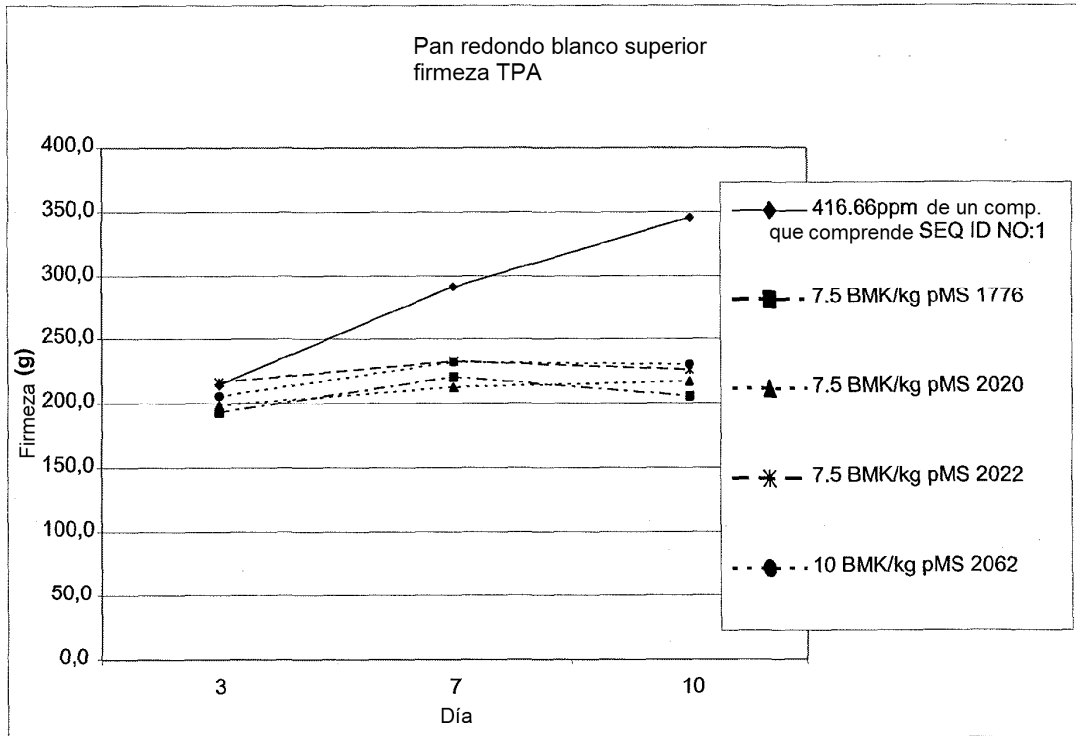


Fig. 1

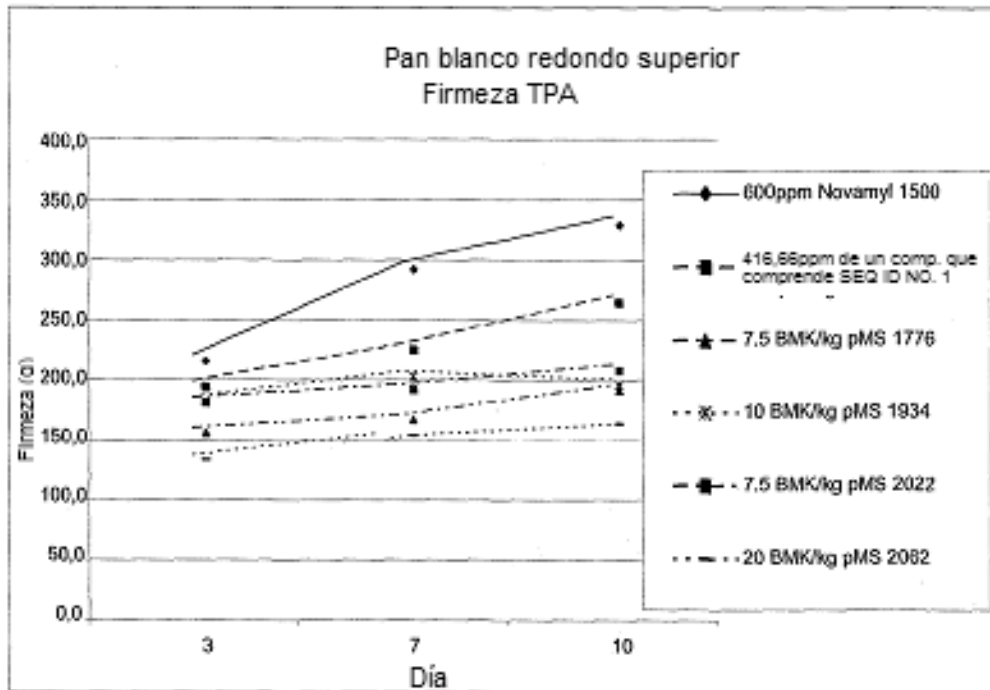


Fig. 2